

**Polarisationsoptische Methodik zur Herstellung
eines 3D Fasermodells des menschlichen Hirnstamms**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Matthias Leunert

geboren am 11.04.1974 in Paris, Frankreich

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Hubertus Axer, Jena
2. PD Dr. med. Christian Ewald, Jena
3. Prof. Dr. med. Diedrich Graf von Keyserlingk, Potsdam

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.10.2014



Pour Papillon

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
C	Lichtgeschwindigkeit (lat. celeritas)
CGPM	Conférence Générale des Poids et Mesures
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
DI	Decussatio lemniscorum
DT-MRI	Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging
DSI	Diffusion spectrum imaging
DTI	Diffusion tensor imaging
DWI	Diffusion weighted imaging
FIm	Fasciculus longitudinalis medialis
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
Fpc	Fibrae pontocerebellares
HARDI	High Angular Resolution Diffusion Imaging
Lm	Lemniscus medialis
m/s	Meter/Sekunde
Med.	Medium
MRT	Magnetresonanztomographie
nm	Nanometer

OP	Operation
Pci	Pedunculus cerebellaris inferior
Pcm	Pedunculus cerebellaris medius
Pcs	Pedunculus cerebellaris superior
PET	Positronen-Emmissions-Tomographie
PLI	Polarized Light Imaging
RGB	Rot Grün Blau
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen
STN	Nucleus subthalamicus
Ts	Tractus spinothalamicus
Tp	Tractus pyramidalis
Vak.	Vakuum
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	8
2	Einleitung	9
2.1	Geschichtliche Aspekte zur Entdeckung der zerebralen Struktur	9
2.2	Gängige methodische Verfahren	15
2.2.1	Faserpräparation nach Klingler	15
2.2.2	Klassische neuroanatomische Färbemethoden	15
2.2.3	Konfokale Lasermikroskopie (CLSM)	16
2.2.4	Diffusion Tensor Imaging und Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging	17
2.3	Zur Polarisationsmikroskopie	18
2.3.1	Optische Grundlagen	18
2.3.1.1	Zum Brechungsgesetz (Hecht 2009)	19
2.3.1.2	Optisch isotrope und anisotrope Medien (Hecht 2009)	19
2.3.1.3	Doppelbrechung (Hecht 2009) und weiße Hirnsubstanz	20
2.3.2	Zur Entdeckung polarisierten Lichts	21
2.3.3	Prinzip der Polarisationsmikroskopie	25
3	Ziel der Arbeit	27
4	Methodik	28
4.1	Materialgewinnung	28
4.2	Hirnstammpräparation	28
4.3	Polarisationsapparatur und Digitalisierung der Hirnstammpräparate	30
4.4	Berechnung der Faserorientierung und Erstellen von Faserorientierungskarten	35
4.5	Darstellung der Neigungs- und Richtungswinkel der Nervenfasern in Graustufen und RGB-Farben	36
4.6	Ausrichtung der Faserorientierungskarten	36
4.7	Segmentierung von Faserbahnen	38

5	<i>Ergebnisse</i>	39
5.1	Faserverlauf im Hirnstamm	39
5.2	3D-Rekonstruktion der Hirnstammfasern	46
6	<i>Diskussion</i>	50
6.1	Brain Mapping	50
6.2	Zur Polarisationsstechnik	51
6.3	Untersuchungen am Großhirn	51
6.4	Zum Hirnstammmodell	53
6.5	Vergleichende Betrachtung von PLI, Diffusionsgewichtetem Imaging (DWI) und Diffusion Tensor Imaging (DTI)	54
7	<i>Schlussfolgerungen</i>	57
8	<i>Literatur- und Quellenverzeichnis</i>	58
9	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	66
10	<i>Anhang</i>	69
10.1	Lebenslauf	69
10.2	Danksagung	70
10.3	Ehrenwörtliche Erklärung	71

1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer Methode zur dreidimensionalen Darstellung von Nervenfaserbahnen im Hirnstamm des adulten menschlichen Gehirns. Hierzu wird ein neues polarisationsoptisches Verfahren entwickelt, das sich die polarisationsoptischen Eigenschaften der Myelinscheiden zunutze macht und erlaubt, den Nervenfaserverlauf in ungefärbten histologischen Schnitten des Gehirns darzustellen und zu beurteilen.

Ein in Formalin fixiertes Gehirn wird zunächst makroskopisch präpariert und anschließend seriell in Schnitte à 100 µm Dicke geschnitten. Von jedem einzelnen Gehirnschnitt werden mit Hilfe einer eigens entwickelten polarisationsoptischen Apparatur und einer Digitalkamera polarisationsoptische Bildsequenzen erzeugt. Anhand dieser sequenzierten Bilder werden mit Hilfe eines Bildverarbeitungsprogramms Neigungs- (über die Tiefe des Präparats) und Richtungswinkel (in der Schnittebene des Präparats) der Nervenfasern automatisiert errechnet. Für jede Gewebescheibe wird dann eine Karte der Faserrichtungswinkel und der Faserneigungswinkel erstellt, die sogenannte Faserorientierungskarte. Aus den Faserorientierungskarten der Hirnschnitte wird dann über eine euklidische Formel die Ausrichtung der Präparate zueinander berechnet und diese werden als dreidimensionales Hirnstammmodell rekonstruiert. Manuell werden anhand der Faserorientierungskarten an jedem Schnitt spezifische Faserbündel segmentiert. Die manuelle Segmentierung erfolgt wegen der individuell notwendigen neuroanatomischen Beurteilung der verschiedenen Verläufe der Faserbündel. Abschließend werden aus den segmentierten Faserkarten dreidimensionale digitalisierte Modelle der Faserbahnen des Hirnstamms generiert (Pyramidenbahn, Lemniscus medialis, Tractus spinothalamicus, Fasciculus longitudinalis medialis, etc.).

Die in dieser Arbeit aufgezeigte Darstellung von Nervenfaserbahnen in Hochauflösung mittels polarisierten Lichts gestattete einen ersten dreidimensionalen Prototyp eines 3D-Hirnstammatlas zu generieren.

2 Einleitung

2.1 Geschichtliche Aspekte zur Entdeckung der zerebralen Struktur

Seit Jahrzehnten nimmt das Verständnis komplexer neuronaler Abläufe kontinuierlich zu. Heute wird mit immer besseren Methoden versucht, neuronale Strukturen dreidimensional darzustellen. Dies dient nicht nur wissenschaftlichen Zwecken, sondern findet besonders im klinischen Alltag seine Anwendung. Kenntnisse der Lokalisation von z.B. neuronalen Steuerungszentren, des Verlaufs von Nervenbahnen und damit der räumlichen Vorstellung der topographischen Zusammenhänge sind in der Neurochirurgie von großer Bedeutung. Diese Kenntnisse spielen aber nicht nur bei neurochirurgischen Eingriffen am Patienten (intraoperatives MRT, Neuronavigation, Stereotaxie etc.) eine große Rolle, sondern sie sind bereits präoperativ beim Einsatz der funktionellen Kernspintomographie, der Computertomographie und der Positronen-Emissions-Tomographie unerlässlich. Die Visualisierung des menschlichen Gehirns in 3D-Optik mit moderner Bildverarbeitung bringt gegenüber den lange üblichen neuroanatomischen Atlanten im 2D-Format den unschätzbaren Vorteil der räumlichen Darstellung neuronaler Vernetzung.

Einer der ersten Versuche, geistige Eigenschaften und emotionale Zustände bestimmten Hirnarealen zuzuordnen, wurde durch den deutschen Arzt und Anatom Franz Joseph Gall (1758-1828, Abb. 1) unternommen. Die von Gall als Phrenologie bezeichnete Lehre (Abb. 2) ging von einem Zusammenhang zwischen Schädel- und Gehirnform einerseits, sowie von Charakter und Geistesgaben andererseits aus. Nach Galls Vorstellung sollten Charaktereigenschaften mit der Größe bestimmter Organe korrelieren: je grösser das Organ, desto ausgeprägter die zugewiesene Charaktereigenschaft. Die Phrenologie wurde jedoch bald aufgrund ihrer ideologisierenden

Vorgehensweise als Pseudowissenschaft bezeichnet. Dennoch lieferte sie den Grundstein für die später entwickelte Neuro- und Kognitionswissenschaft (Struve 1843).

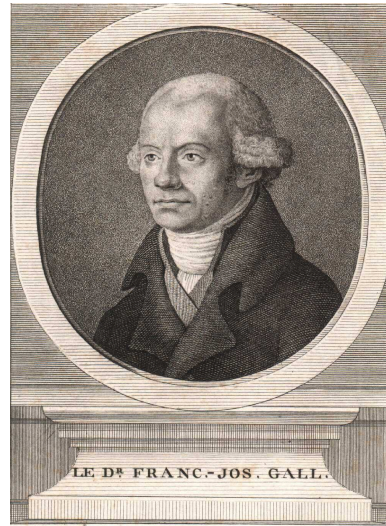


Abb. 1: Portrait von Dr. Franz Joseph Gall

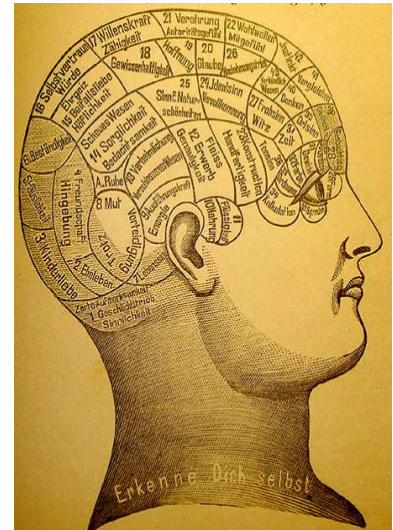


Abb. 2: Phrenologie

Die ersten aufgezeichneten wissenschaftlichen Untersuchungen zur deskriptiven Lokalisationslehre der motorischen Hirnrinde verdanken wir dem deutschen Anatom und Physiologen Gustav Theodor Fritsch (1838-1927, Abb. 3) sowie dem Hirnforscher Eduard Hitzig (1838-1907, Abb. 4). Gemeinsam führten sie Experimente zur Elektrostimulation des Frontallappens an Hunden durch (Fritsch und Hitzig 1870). Als erste gelang es ihnen, einzelne Funktionen bestimmten Regionen der Großhirnrinde zuzuordnen.



Abb. 3: Portrait von Prof. G. T. Fritsch



Abb. 4: Portrait von Prof. E. Hitzig

Der französische Anthropologe und Arzt Pierre Paul Broca (1824-1880, Abb. 5) beschrieb 1861 das limbische System und führte empirische Beobachtungen an Hirnverletzten sowie an Schlaganfallpatienten durch. Bekannt wurde der Fall des „Monsieur Tan“, der aufgrund einer motorischen Aphasie, jedoch ohne Beeinträchtigung des Sprachverständnisses, einzig die Silbe „Tan“ aussprechen konnte. Die bei der postmortalen Autopsie entdeckte Läsion zwischen linkem Frontal- und Temporallappen im Bereich der Pars triangularis des Gyrus frontalis inferior gilt seitdem als neurogener Ort für die Entstehung von Sprache und wird als motorisches Sprachzentrum bezeichnet (Friederici 2003). Dieses so genannte „Broca-Areal“ ist durch den Fasciculus arcuatus mit dem „Wernicke-Areal“ verbunden, das von dem deutschen Neurologen und Psychiater Carl Wernicke (1848-1905, Abb. 6) beschrieben wurde. Es liegt am Gyrus temporalis superior und stellt das sensorische Sprachzentrum dar.



Abb. 5: Portrait von Dr. P. P. Broca



Abb. 6: Portrait von Prof. C. Wernicke

Korbinian Brodmann (1868-1918, Abb. 7), ein deutscher Neuroanatom und Psychiater, veröffentlichte 1909 den ersten, auf histologischen Gesichtspunkten beruhenden, Atlas der Großhirnrinde: „Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund ihres Zellenbaues“ (Brodmann 1909). Er unterteilt die Großhirnrinde in 52 Areale (Abb. 8), die bis heute nach ihm benannt sind. So wird das oben genannte Broca-Areal den Brodmann Arealen 44 und 45 zugeteilt, das Wernicke-Areal dem Brodmann Areal 22.



Abb. 7: Portrait von Prof. K. Brodmann

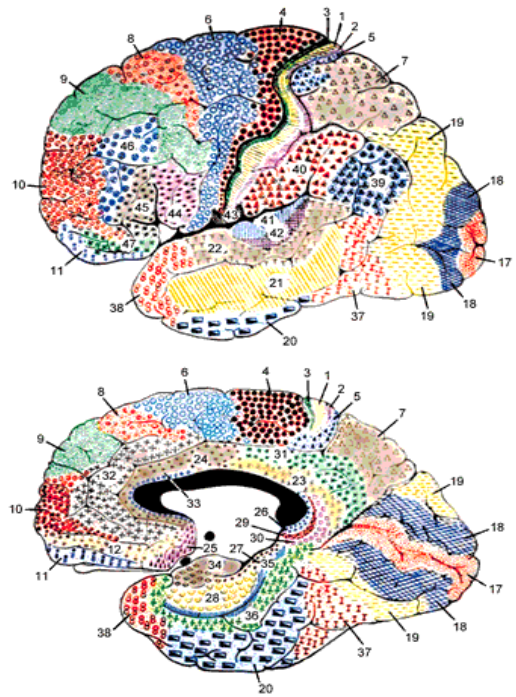


Abb. 8: Brodmann Areale

Nicht zuletzt sei Wilder Penfield (1891-1976, Abb. 9) erwähnt. Der kanadische Neurochirurg arbeitete in den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts an einer experimentell gestützten Zuordnung von Hirnfunktion und Lokalisation bei Epileptikern (Penfield 1937). Berühmt wurde seine schematische Darstellung der Körperprojektionen und der Grössenverhältnisse der Projektionsfelder im motorischen Kortex des Gehirns, die als so genannter „Homunculus“ (Abb. 10, Originalzeichnung des Homunculus nach Penfield) in die Lehrbücher einging (Düweke 2001).



Abb. 9: Portrait von Prof. W. Penfield



Abb. 10: Penfields kortikaler Homunculus

In der heutigen Zeit basieren Atlanten der Neurowissenschaften zumeist auf histologischen Methoden, z.B. der Zytoarchitektur nach Brodmann, der Rezeptorautoradiographie oder der Immunzytochemie (Talairach 1967, Talairach und Tournoux 1988, Ono et al. 1990, Geyer et al. 1997). Ausserdem bedient man sich dreidimensionaler Schnittbildtechniken, wie Computertomographie und Magnetresonanztomographie (Damasio 1995). Untersuchungsmethoden wie die Positronen-Emissions-Tomographie (Minoshima et al. 1994) oder die funktionelle Magnetresonanztomographie (Le Bihan 1996) zielen auf die Untersuchung von Hirnarealen hinsichtlich spezifischer Funktionen. Die Magnetoenzephalographie existiert seit 1968 als ergänzendes diagnostisches Verfahren und wird beispielsweise in der präoperativen Planung der Gehirntumorextirpation oder der Lokalisation von Hirnläsionen nach epileptischen Anfällen eingesetzt.

Neuronale Verschaltungen und neuronale Netzwerke sind nicht nur für die Funktionen von neuropsychologischen Prozessen wie Aufmerksamkeit, Sprache und Lernen von großer Bedeutung (Mesulam 1990), sondern ebenso grundlegend für die direkte neurologische und neurochirurgische Behandlung der Patienten (z.B. fMRT). Um anatomische Computermodelle von Nervenfasern herzustellen, wurden verschiedene Methoden entwickelt. Deren

wichtigste und gängigste Methoden werden im Folgenden vorgestellt und dienen dem Vergleich der Bildgebung mittels polarisierten Lichts.

2.2 Gängige methodische Verfahren

2.2.1 Faserpräparation nach Klingler

Die makroskopische Dissektionstechnik nach Josef Klingler (1888-1963) ist ein konventionelles anatomisches Verfahren, um Nervenfasern im menschlichen Gehirn darzustellen. Bei dieser Methode wird ein formalinfixiertes Gehirn bei -5°C bis -10°C wiederholt eingefroren und aufgetaut. Im Präparat bilden sich Eiskristalle, die die Nervenfasern leicht auseinander weichen lassen. Dadurch wird die anschließende makroskopische Präparation erheblich erleichtert. Das Verfahren wurde 1934 in Basel entwickelt. In der Folge ließen sich mit dieser Methode zahlreiche Faserbahnen in ihrem Verlauf darstellen und beschreiben (Klingler 1935, Ludwig und Klingler 1956, Klingler und Gloor 1960). Die Präparation nach Klingler bildet die Grundlage der anatomischen Nomenklatur und des Verständnisses der Faserbahnen des menschlichen Gehirns (Agrawal et al. 2011).

2.2.2 Klassische neuroanatomische Färbemethoden

Der deutsche Pathologe Carl Weigert (1845-1904) war der Erste, der 1874 eine Methode zur Färbung von Markscheiden (Axone, Dendriten) entwickelte. Dazu musste zunächst die Löslichkeit der Lipide herabgesetzt werden. Dies geschah durch Vorbehandlung des Präparats mit chrom- und kupferhaltigen Flüssigkeiten. Anschließend wurde das Präparat mit Eisenhämatoxin

behandelt, wodurch die Markscheiden blauschwarz und die graue Substanz hellgelb hervortraten. Die Darstellung der weißen Substanz des Gehirns erfolgte somit vergleichsweise bereits sehr frühzeitig (Dejerine 1901, Vogt, 1902). Weitere Färbemethoden wie etwa die Golgi-Färbung (so genannte „schwarze-Reaktion“, vollständiges Hervortreten einzelner Neurone), die Versilberung einzelner Neurone mit Silbernitrat (Cajal 1906), oder die Nissl-Färbung, spiegeln den Verlauf der Faserbahnen ebenfalls sehr gut wieder. Eine wertvolle Methode kam 1953 durch die Luxol Fast Blue Färbemethode nach Klüver und Barrera hinzu (Klüver und Barrera 1953). Bei dieser Methode ist eine Vorbehandlung des Materials nicht notwendig. Der Farbstoff zeigt eine selektive Affinität zum Neurokeratingerüst. Die Markscheiden erscheinen blau, die graue Substanz leuchtet blass grün und die Kerne färben sich dunkelblau an.

Zugänglich sind diese „klassischen Methoden“ unter Anwendung des Lichtmikroskops. Sie bleiben jedoch im zweidimensionalen Bild und informieren nur indirekt über die dreidimensionale Struktur des Gehirns. Verwiesen sei allerdings auch auf das jüngst entwickelte konfokale Lasermikroskop, das heute einen nochmals tieferen Einblick in die Hirnzellenarchitektur gestattet und den Schritt zur 3D-Abbildung macht.

2.2.3 Konfokale Lasermikroskopie (CLSM)

Wird bei der konventionellen Mikroskopie das gesamte Präparat einheitlich durchleuchtet und werden nicht fokussierte Strukturen unscharf abgebildet, so gestattet die auf Fluoreszenzanregung begründete konfokale Lasermikroskopie, nur einen Bruchteil des vom Präparat reflektierten Fluoreszenzlichts zu analysieren (Wright et al. 1993). Im konfokalen Mikroskop wird das Präparat niemals in seiner gesamten Stärke abgebildet, sondern durch Filterung (Source Pinhole) wird auf lediglich eine minimale Präparatebene fokussiert. Die Schärfentiefe, auch „Out-of-Focus-Unschärfe“ genannt, wird dadurch erheblich verringert, zugleich aber steigt die Auflösung. Zusätzlich zum Beleuchtungselement wird das bildaufnehmende System, „Detection Pinhole“

genannt, auf die beleuchtete Präparatebene fokussiert (konfokal = optische Systeme mit einem gemeinsamen Brennpunkt, hier Laser und bildaufnehmendes System). Ein dreidimensionales Objekt entsteht durch Digitalisierung zahlreicher Bildebenen, die der Laser vom fluoreszierenden Präparat abtastet. Das Verfahren wurde 1955 von Marvin Minsky entwickelt (Minsky 1988). Seinerzeit wurde als Lichtquelle noch Weißlicht verwendet. Heute stehen weitere mikroskopische Verfahren zur dreidimensionalen Bildgebung, z.B. die Multiphotonenmikroskopie, die Stimulated Emission Depletion-Mikroskopie (STED-Mikroskopie) und die Lokalisationsmikroskopie nach Photoaktivierung zur Verfügung.

2.2.4 Diffusion Tensor Imaging und Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging

Diffusion Tensor Imaging (DTI) und Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging (DWI) werden als diffusionsgewichtete Bildgebungsverfahren bezeichnet. Die diffusionsgewichtete Bildgebung ist ein nichtinvasives Verfahren, das keine potentiell schädliche ionisierende Strahlung aussendet. Hierdurch ist es möglich, die Untersuchung am Patienten selbst durchzuführen. Die Methode wurde Mitte der 1990er Jahre entwickelt, und wird insbesondere bei Erkrankungen der Substantia alba (z.B. sklerosierende Panenzephalitis, multiple Sklerose) eingesetzt. Die diffusionsgewichtete Bildgebung hat seitdem eine vorherrschende Stellung sowohl bei der Erforschung der Hirnanatomie als auch bei der Beurteilung der Hirnfunktionen und der Hirnpathologie eingenommen (Jones et al. 2002, Wakana et al. 2004). Mit dieser Untersuchung ist es möglich, die Diffusionsbewegung von Wassermolekülen in verschiedenen Raumebenen zu messen (Basser et al. 1994a, Beaulieu 2002). Im Gegensatz zum Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging (DWI), bei dem pro Volumenelement (Voxel) ein einzelner Zahlenwert im Schnittbild als Grauwert ohne klare Hauptrichtung dargestellt wird, wird beim Diffusion Tensor Imaging (DTI) ein Tensor, auch „multilineare Abbildung“ genannt, berechnet, der das Diffusionsverhalten der Wassermoleküle dreidimensional darstellt.

Vorhergehende Studien (Douek et al. 1991, Le Bihan et al. 1993, Coremans et al. 1994, Mori und Barker 1999) haben gezeigt, dass die Diffusion in Richtung der Faserbahnen ihr Maximum erreicht, während sie senkrecht dazu stark eingeschränkt ist. Die Richtung des größten Diffusionskoeffizienten, die in DTI-Schnittbildern farblich dargestellt wird, spiegelt den Längsverlauf der Nervenfasern wieder (Basser et al. 1994b, Mori und Van Zijl 2002). Die Orientierung der Faserbahnen wird durch sogenannte „Diffusion tensor maps“ dargestellt. Mittels DTI-Datensatz kann dann ein dreidimensionales Fasertracking erfolgen, um einzelne Nervenfaserbündel zu verfolgen. Dieses kommt verbreitet in der Planung neurochirurgischer Operationen zur Anwendung. Beispielsweise ist es von großer Bedeutung zu wissen, ob ein Tumor bereits in eine Faserbahn, z.B. die Pyramidenbahn, eingedrungen ist und somit eine Operation überhaupt noch sinnvoll erscheint. Auch wird DTI in der Akutphase einer Hirnischämie zur Diagnostik herangezogen (Moseley et al. 1990). Das Hauptaugenmerk vieler Forschergruppen liegt aktuell darin, diffusionsgewichtete Aufnahmen mit sehr vielen verschiedenen Faserverlaufsrichtungen zu erstellen, um komplexes Diffusionsverhalten besser erfassen zu können (High Angular Resolution Diffusion Imaging = HARDI).

2.3 Zur Polarisationsmikroskopie

2.3.1 Optische Grundlagen

Licht ist eine für den Menschen sichtbare elektromagnetische Strahlung, die sich als Welle im Vakuum mit konstanter Geschwindigkeit ausbreitet. Seine Wellenlänge reicht von 380 nm bis 780 nm. 1983 wurde während der 17. Generalkonferenz für Maß und Gewicht, CGPM, in Sèvres der Zusammenhang zwischen einem Meter und der Lichtgeschwindigkeit definiert: „ein Meter ist diejenige Strecke, die Licht im Vakuum binnen des 299 792 458sten Teils einer

Sekunde zurücklegt“ (Resolution zur Definition des Meters, 17. CGPM-Tagung, 1983). Dementsprechend wurde die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum definiert als $c = 299792458 \text{ m/s}$. Licht aus einer gewöhnlichen Lampe ist nicht polarisiert und breitet sich sowohl als elektrisches als auch als magnetisches Feld aus. Es schwingt dabei als Transversalwelle senkrecht zu seiner Ausbreitungsgeschwindigkeit in alle Richtungen aus. Von Polarisation spricht man, wenn das elektrische Feld ausschließlich senkrecht in einer Ebene zur Ausbreitungsrichtung steht (Perkowitz 1998, Walther und Walther 1999). Eingehende Untersuchungen zum Prinzip der Polarisation von Licht und der elektromagnetischen Wellentheorie wurden von Larsen et al. (2007) durchgeführt.

2.3.1.1 Zum Brechungsgesetz (Hecht 2009)

Trifft ein Lichtstrahl auf ein Medium wie zum Beispiel Wasser, so wird er zum Lot gebrochen und die Ausbreitungsrichtung ändert sich. Dieses Verhalten wird durch das Snelliussche Gesetz beschrieben (Willebrord van Roijen Snell, 1580-1626). Eine Lichtwelle, die ein Medium durchdringt, wird in ihrer Geschwindigkeit durch die verschiedenen atomaren Moleküle des Mediums gebremst. Dies bedeutet, dass die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichtes in einem Medium (c_{med}) langsamer als im Vakuum (c_{vak}) ist. Dieses Verhältnis wird als Brechungsindex n bezeichnet. Es gilt: $n = c_{\text{vak}} / c_{\text{med}}$. Daraus kann berechnet werden, um wie viele Male größer die Vakuumlichtgeschwindigkeit c_{vak} im Vergleich zur Lichtgeschwindigkeit im Medium c_{med} ist. Der Brechungsindex von Wasser ist 1,333.

2.3.1.2 Optisch isotrope und anisotrope Medien (Hecht 2009)

Ist die Ausbreitung einer Strahlung innerhalb eines Mediums in allen Richtungen gleich, so spricht man von einem optisch isotropen Medium. In einem solchen Medium, z.B. optischem Glas, breitet sich das Licht unabhängig

vom Strahlungseinfall in alle Richtungen mit der gleichen Geschwindigkeit aus. Der Brechungsindex ist in diesem Fall nach allen Richtungen hin gleich. Breiten sich Lichtwellen in verschiedenen Richtungen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit aus, so spricht man von optisch anisotropen, also richtungsunabhängigen, Medien. Diese Medien, z.B. Kristalle, sind so aufgebaut, dass einfallendes Licht nur in zwei zueinander senkrecht orientierten Ebenen schwingen kann. Wird das Licht und damit die Schwingungsebene gedreht, so verändert sich der Brechungsindex mit jeder einzelnen Schwingungsrichtung.

2.3.1.3 Doppelbrechung (Hecht 2009) und weiße Hirnsubstanz

Ein Lichtstrahl wird einfach gebrochen, wenn er auf ein isotropes Material trifft. Dagegen wird der Strahl in zwei Richtungen gebrochen, wenn er auf anisotrope Materialien trifft. Dieses Phänomen wird Doppelbrechung genannt. Es wurde erstmals im Jahre 1669 von dem dänischen Arzt und Physiker Erasmus Bartholinus (1625-1698, Abb. 11) am Beispiel des isländischen Calcit-Kristalls, auch Doppelspat genannt, beschrieben (Bartholini 1669).



Abb. 11: Portrait von Prof. Erasmus Bartholinus

Sobald ein Lichtstrahl senkrecht auf ein doppelbrechendes Material trifft, wird er in zwei linear polarisierte Teilstrahlen aufgespalten. Der ungebrochene Strahl wird ordentlicher Strahl, der gebrochene Strahl außerordentlicher Strahl genannt. Die Schwingungsebene des außerordentlichen Strahls steht senkrecht zu der des ordentlichen Strahls.

Die weiße Substanz des Gehirns wird durch die Leitungsbahnen des zentralen Nervensystems gebildet. Diese Leitungsbahnen werden von Myelin umgeben. Myelin wird von Oligodendrozyten gebildet. Die zellulären Fortsätze der Oligodendrozyten bilden die sogenannten Markscheiden, indem sie die Axone der Nervenzellen umhüllen. Sie dienen dazu, die Axone elektrisch zu isolieren. Myelin weist einen besonders hohen Lipidgehalt auf. Die Lipide sind radial zur Nervenfaser angeordnet. Als weiteren Bestandteil enthält das Myelin Proteine, die tangential zur Nervenfaser angeordnet sind. Diese spezielle Anordnung ist für eine „positive“ Doppelbrechung des Myelins in der Polarisationsmikroskopie verantwortlich (Morell et al. 1989).

Die Eigenschaft der positiven Doppelbrechung des Myelins macht man sich zur Erforschung der weißen Substanz zunutze. Die Lipide setzen sich aus ca. 25 % Cholesterin, 20 % Galactocerebrosid, 5 % Galactosulfatid und 50 % weiteren Phospholipiden, insbesondere Phosphatidylethanolamin und Lecithin, zusammen (Arroyo und Scherrer 2000). Die Proteine werden durch Myelin-basisches-Protein, Proteolipid-Protein, Myelin-assoziiertes Glykoprotein, Connexin 32 und Myelin-Oligodendrozyten-Protein charakterisiert. Dabei ist der hohe Lipidgehalt für die weiße Farbgebung des Myelins verantwortlich.

2.3.2 Zur Entdeckung polarisierten Lichts

Polarisiertes Licht wurde von dem französischen Physiker Etienne Louis Malus (1775-1812, Abb. 12) entdeckt, als dieser durch ein Kalkspatprisma die untergehende Sonne betrachtete (Gerlach 2008). In seinem Gesetz beschreibt er die Abhängigkeit der Intensität „I“ einer linear polarisierten Welle der

Anfangsintensität „ I_0 “ nach Durchtritt durch einen Polarisator, dessen Transmissionsachse mit der Schwingungsrichtung des Lichts den Winkel α bildet (Hüttermann et al. 2004):

$$I = I_0 \cos^2(\alpha)$$



Abb. 12: Portrait von Etienne Louis Malus

Das erste Polarisationsmikroskop wurde im Jahre 1816 von dem schottischen Physiker David Brewster (1781-1861, Abb. 13) aus einem einfachen Mikroskop umgebaut (Gerlach 2008). In seinem „Handbuch der Optik“ schreibt er: „Durch eine sehr ausgedehnte Reihe von Versuchen, die ich mit verschiedenen festen und flüssigen Körpern anstellte, um das Maximum des Polarisationswinkels zu bestimmen, wurde ich im Jahre 1814 auf das einfache Gesetz geleitet: der Brechungsexponent ist die Tangente des Polarisationswinkels“ (Brewster 1835).



Abb. 13: Portrait von Dr. David Brewster

Das Brewster'sche Gesetz lautet:

$$\theta_B = \arctan\left(\frac{n_2}{n_1}\right)$$

Der Polarisationswinkel wird als Brewster'scher Winkel bezeichnet. Er wird aus dem Snelliusschen Brechungsgesetz errechnet:

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$$

$$n_1 \sin(\theta_B) = n_2 \sin(90^\circ - \theta_B) = n_2 \cos \theta_B$$

Einen weiteren Schritt hin zu unseren heute verwendeten Polarisationsmikroskopen unternahm der englische Physiker und Chemiker William Henry Fox Talbot (1800-1877, Abb. 14). Er baute ein gängiges Lichtmikroskop in ein Polarisationsmikroskop um, indem er ein so genanntes Nicol'sches Prisma sowohl als Polarisator als auch als Analysator einsetzte. Nachteilig war, dass das Gesichtsfeld erheblich eingeschränkt wurde (Gerlach 2008).



Abb. 14: Portrait von William Henry Fox Talbot

Das erste vollständige Polarisationsmikroskop (Abb. 16) wurde 1830 von dem italienischen Astronom, Optiker, Mathematiker und Physiker Giovanni Battista Amici (1786-1863, Abb. 15) entwickelt (Gerlach 2008). Das erste deutsche Polarisationsmikroskop baute schließlich Heinrich Ludwig Rudolf Fuess (1838-1917) im Jahre 1875 in Berlin, wo er es für petrographische Untersuchungen einsetzte (Zaun 2002).



Abb. 15: Portrait von Prof. G. B. Amici

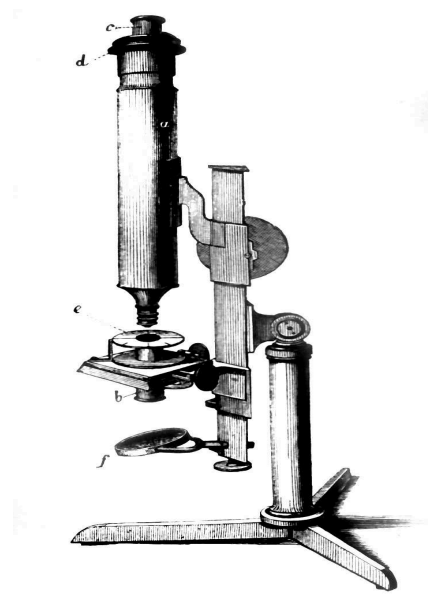


Abb. 16: Polarisationsmikroskop

2.3.3 Prinzip der Polarisationsmikroskopie

Ziel der Polarisationsmikroskopie ist die Identifizierung optisch anisotroper, also doppelbrechender Substanzen und die Analyse ihrer optischen Eigenschaften. Dazu wird das zu untersuchende Medium zwischen zwei um neunzig Grad gedrehte senkrecht zueinander stehende linear polarisierende Polfilter positioniert. Unpolarisiertes Licht trifft auf den ersten Polfilter, den so genannten Polarisator oder Primärfilter. Der Polarisator erzeugt daraus einen polarisierten Lichtstrahl, dessen Schwingungsrichtung vollständig vom dahinterliegenden zweiten Polfilter absorbiert wird. Dieses Phänomen nennt man Auslöschungsregel. Die Auslöschungsregel gilt für alle optisch isotropen Medien. Das Bild erscheint im Bereich der vollständigen Lichtabsorption dunkel. Trifft der polarisierte Strahl auf eine Substanz mit doppelbrechenden Eigenschaften, so wird die Schwingungsebene des Lichts gedreht. Ein Teil des gedrehten Lichts dringt durch den zweiten Filter, den Analysator. Die doppelbrechenden Strukturen werden sichtbar. Ist der senkrecht stehende Polarisator gegen den Analysator um neunzig Grad gedreht, werden diese als

gekreuzte Polarisatoren bezeichnet. Werden zwei Teilstrahlen durch den Analysator in eine identische Schwingungsebene gedreht, so können sie miteinander interferieren. Dadurch entstehen die für die Polarisationsmikroskopie typischen farbigen Bilder.

3 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, basierend auf der doppelbrechenden Eigenschaft der Myelinscheide, eine hochauflösende dreidimensionale Darstellung der Nervenfaserorientierungen in Serienschnitten eines menschlichen Hirnstamms zu generieren. Hierzu wurde das Prinzip der Polarisationsmikroskopie genutzt. Dafür wurde eine eigens modifizierte Polarisationsapparatur entwickelt. Diese neue neuroanatomische Herangehensweise diente dazu, Nervenfaserbahnen aus histologischen Hirnschnitten darzustellen. Dadurch können zwei verschiedene Faseratlanten generiert werden. Zum einen ist es anhand dieser Methode möglich einen Faserorientierungsatlas zu kreieren, welcher einen Vektor pro Volumenelement und somit die Richtung einzelner Fasern in jedem Pixel darstellt (Abb. 33). Zum anderen kann ein volumenbasierter Atlas entstehen, welcher die wichtigsten Nervenfaserbahnen dreidimensional darstellt (Abb. 34). Beide Atlanten können dann zur Validierung von DTI-Datensätzen oder zur Planung neurochirurgischer Eingriffe herangezogen werden. Diese neuentwickelte Methode wurde hier probeweise auf den Hirnstamm eingesetzt, um später auf die Darstellung von Nervenfaserbahnen im gesamten Hirn ausgearbeitet zu werden. Die bisherigen Faseratlanten basieren vorzugsweise auf zytoarchitektonischen Färbemethoden. Die hier beschriebene Methodik ist die Basis, um aus generierten Bildern ein digitales dreidimensionales Fasermmodell zu erschaffen, das elektronisch aus allen Richtungen betrachtbar, als Grundlage sowohl für den Auszubildenden als auch für den Operateur zur Vorbereitung seiner OP dienen kann. Abschließend werden aktuelle Forschungsergebnisse vorgestellt, die als Weiterentwicklung dieser Methode gewonnen werden konnten.

4 Methodik

4.1 Materialgewinnung

Das Gehirn einer 70-Jährigen Frau, die ihren Körper nach ihrem Tod für die medizinische Forschung und Lehre gespendet hatte (Körperspendeprogramm des Instituts für Anatomie an der RWTH Aachen), wurde aus dem Schädel entnommen. Es wurde ca. drei Wochen lang in einer 4%igen Formalinlösung fixiert. Zur makroskopischen Präparation wurden die Meningen entfernt. Der Hirnstamm (Mesencephalon, Pons, Medulla oblongata) wurde sauber entnommen. Das Kleinhirn wurde an den Kleinhirnstielen, das Großhirn oberhalb der Crura cerebri, abgetrennt.

4.2 Hirnstammpräparation

Der Hirnstamm wurde parallel zur Meinert-Achse in vier 1 cm dicke Scheiben geschnitten. Die Scheiben wurden zur Kryoprotektion 24 Stunden lang zunächst in 10%ige Saccharose-Lösung gelegt, für weitere 24 Stunden in 30%ige Saccharose-Lösung überführt und anschliessend bei -75°C eingefroren. Die einzelnen Hirnstammscheiben wurden mit einem Gefriermikrotom (HM 500 OM, Microm, Walldorf, Deutschland, Abb. 17) seriell in Scheiben à 100 µm Dicke geschnitten (Abb. 18). Insgesamt wurden 258 Gefrierschnitte zur weiteren Aufarbeitung herangezogen.



Abb. 17: Gefriermikrotom HM 500 OM, Walldorf

Diese Schnitte wurden ohne spezielle Färbung mit dem wasserlöslichen Einbettungsmedium Aquatex® (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt. Auf diese Weise blieben die fetthaltigen Myelinbestandteile im Gewebe erhalten. Die Fette der Myelinscheide sind für die doppelbrechenden Eigenschaften des Myelins verantwortlich.



Abb. 18: Hirnschnitte

4.3 Polarisationsapparatur und Digitalisierung der Hirnstammpräparate

Die photographische Dokumentation und die Digitalisierung der seriellen Hirnstammschnitte erfolgte mittels einer eigens für unsere Zwecke entwickelten und selbst gebauten Polarisationsoptik (Abb. 23; 24). Die von uns verwendete Apparatur setzte sich aus zwei gekreuzten Polarisatoren, einer dazwischen eingebrachten einschwenkbaren Viertelwellenplatte, einem fixierten Objektträgertisch, einer Digitalkamera und einer Bildverarbeitungseinheit (Pentium PC) zusammen (Abb. 19).

Die Apparatur ermöglichte, die Polarisationsfilter zu rotieren, während das Präparat immobil blieb. Die Apparatur wurde um eine Viertelwellenplatte, die unmittelbar hinter dem Präparat und vor dem Analysator eingebracht wurde, erweitert (Abb. 19). Die Viertelwellenplatte verändert die Polarisation und Phase der durchtretenden elektromagnetischen Wellen. Sie verzögert das linear polarisierte Licht um eine viertel Wellenlänge und erzeugt elliptisch polarisiertes Licht. Ein Teil davon passiert den Analysator und liefert Informationen über die Faserorientierung im Präparat. Die radial angeordneten Lipide der myelinisierten Nervenfasern verändern die Schwingungsebene des Lichts, das dann den zweiten, senkrecht zum ersten, angeordneten Polarisationsfilter (den Analysator) durchdringt und mittels einer Kamera erfasst wird. Die Fasern treten damit im histologischen Präparat deutlich hervor (Schmidt 1924, Scheuner und Hutschenreiter 1972).

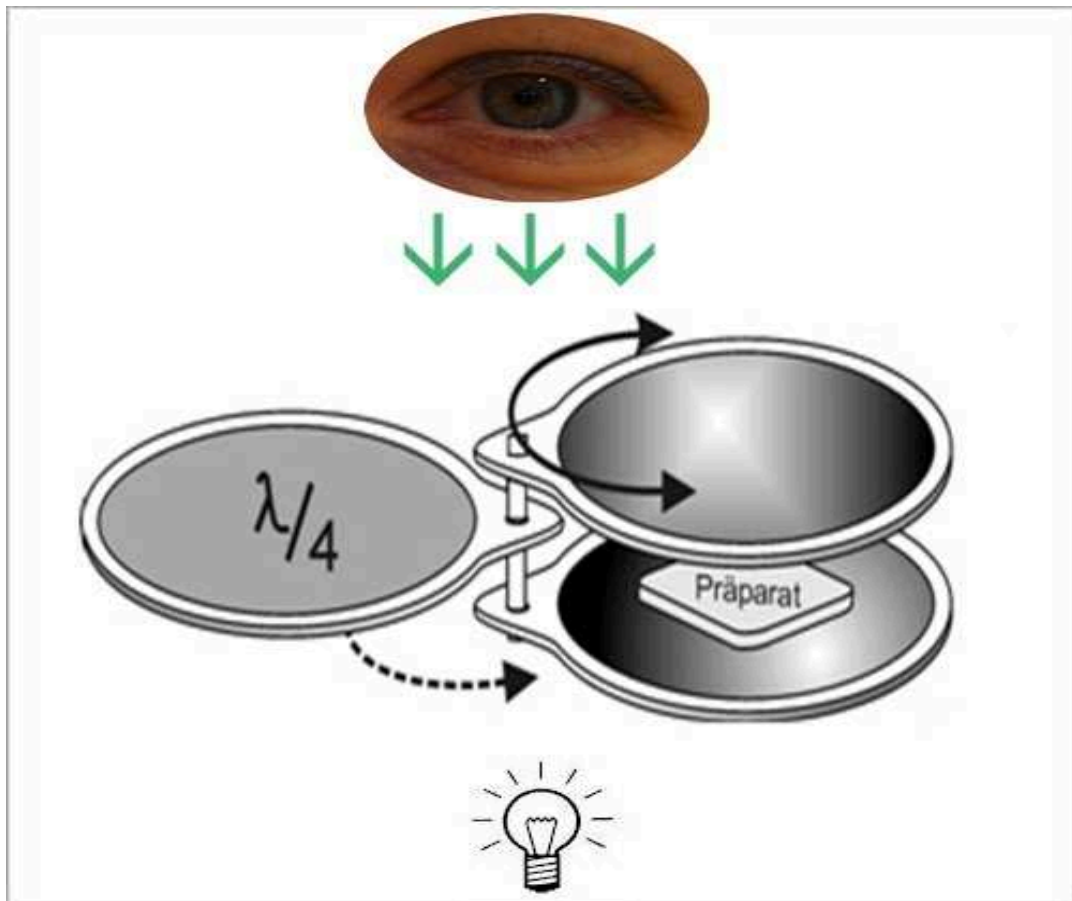


Abb. 19: schematische Darstellung der Polarisationsapparatur

Eine Digitalkamera (Sony DXC-930P 3CCD) wurde über dem Präparat senkrecht ausgerichtet. Sie war an einen Pentium Personal Computer mit dem Betriebssystem Windows NT von Microsoft angeschlossen. Der Vergrößerungsmaßstab der Kamera wurde so eingestellt, dass ein Pixel der digitalisierten Bilder eine Fläche von $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$ des Präparats repräsentierte. Die Einstellung des Systems (Vergrößerung, Kontrast, Helligkeit) wurde während der gesamten Messdauer konstant gehalten. Unter Rotation der Filterkombination wurden Sequenzen polarisationsoptischer Bilder erzeugt. Diese ließen sich so auswerten, dass eine quantitative Ermittlung sowohl des Neigungswinkels als auch des Richtungswinkels für jedes Pixel erfolgen konnte (Axer et al. 2001a, Axer et al. 2000). Die Neigung der Fasern wurde dabei als die Orientierung der Fasern in z-Richtung des Präparates und die Richtung der Fasern als die Orientierung der Fasern in xy-Richtung des Präparates definiert.

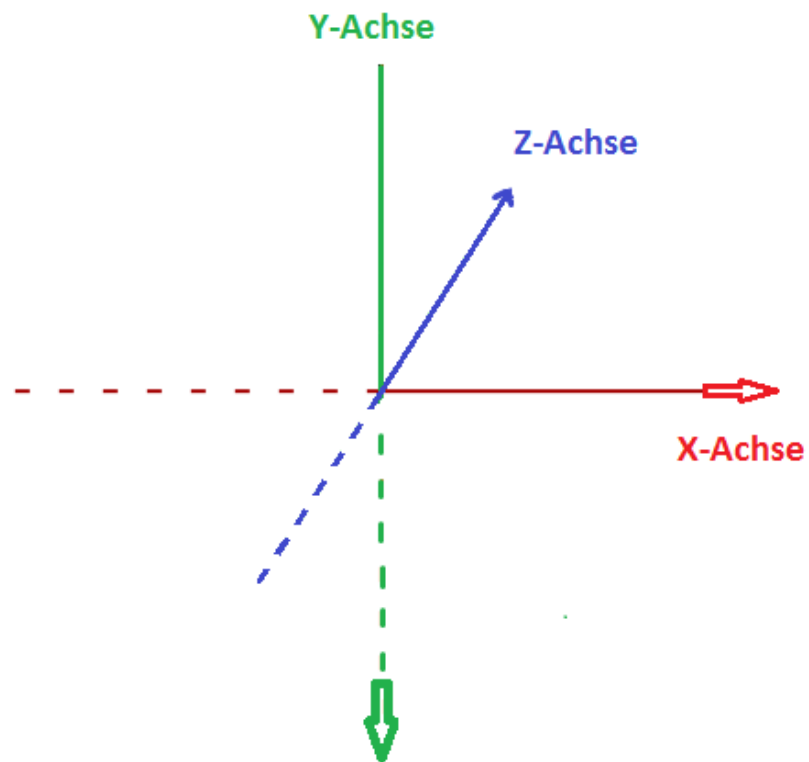


Abb. 20: 3D-Koordinatensystem

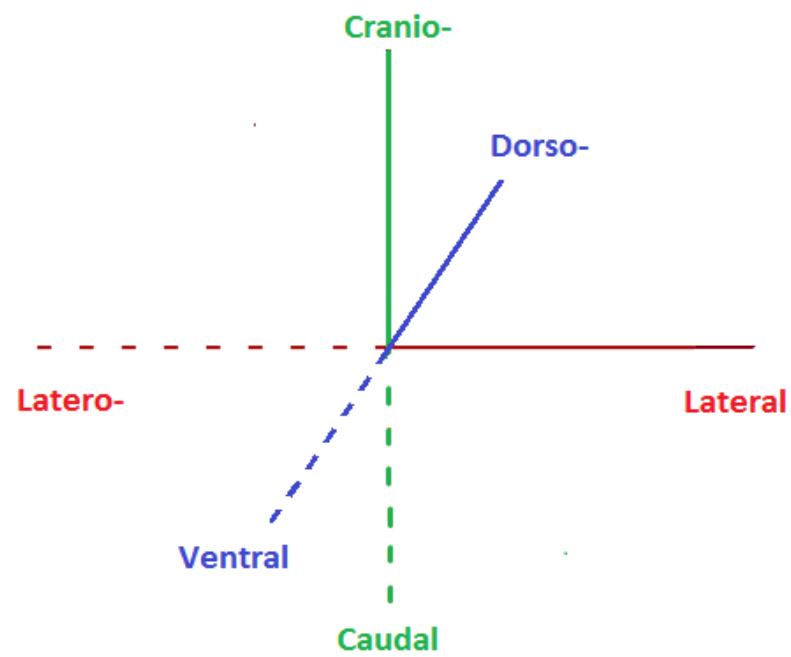


Abb. 21: Anatomisches 3D-Koordinatensystem

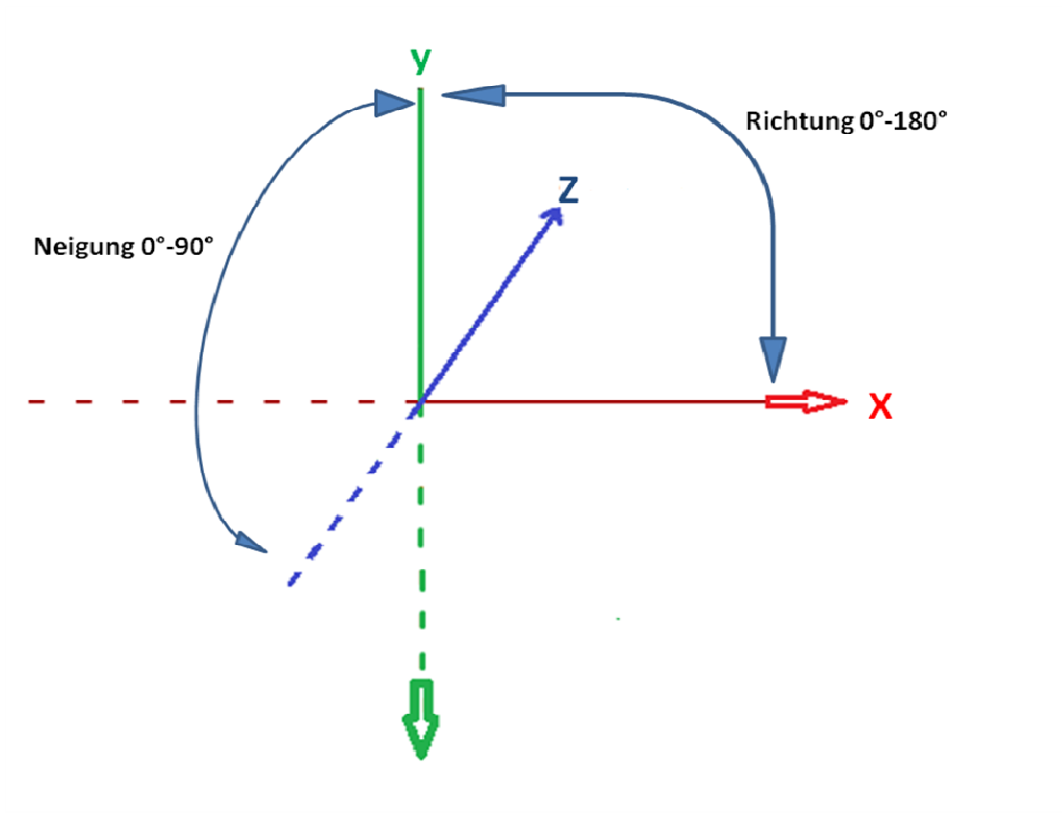


Abb. 22: 3D-Koordinatensystem mit Richtungs- und Neigungswinkeln

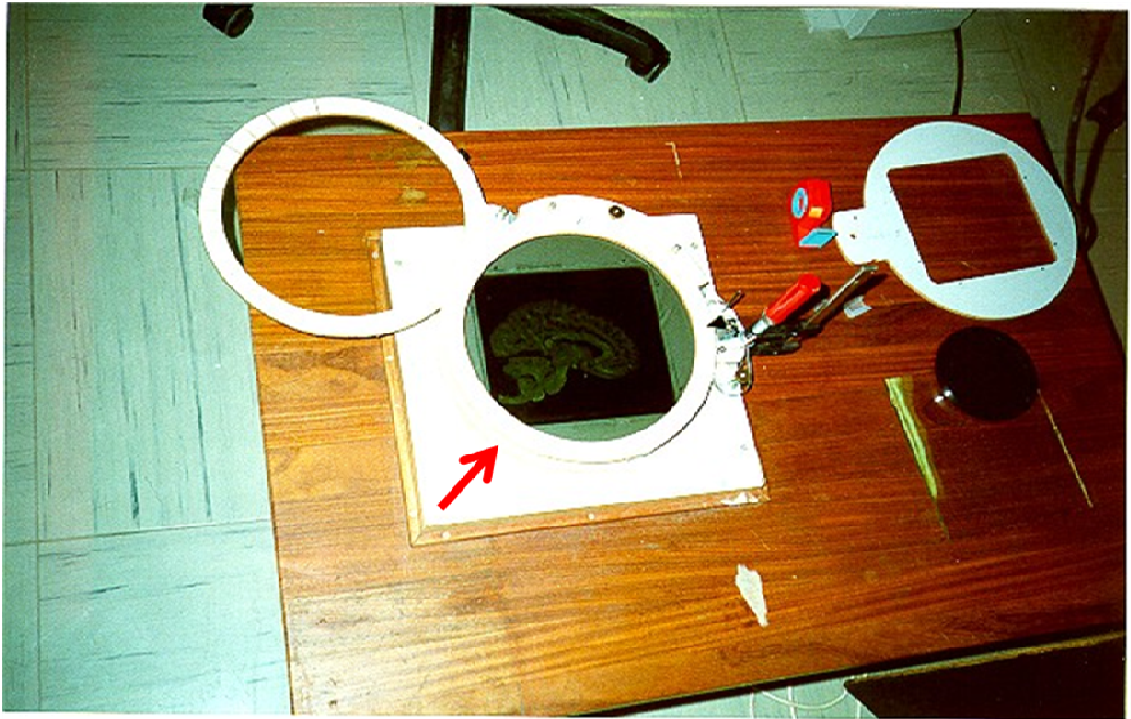


Abb. 23: Polarisationsapparat mit gekreuzten Polarisatoren, Viertelwellenplatte und Objektträgertisch

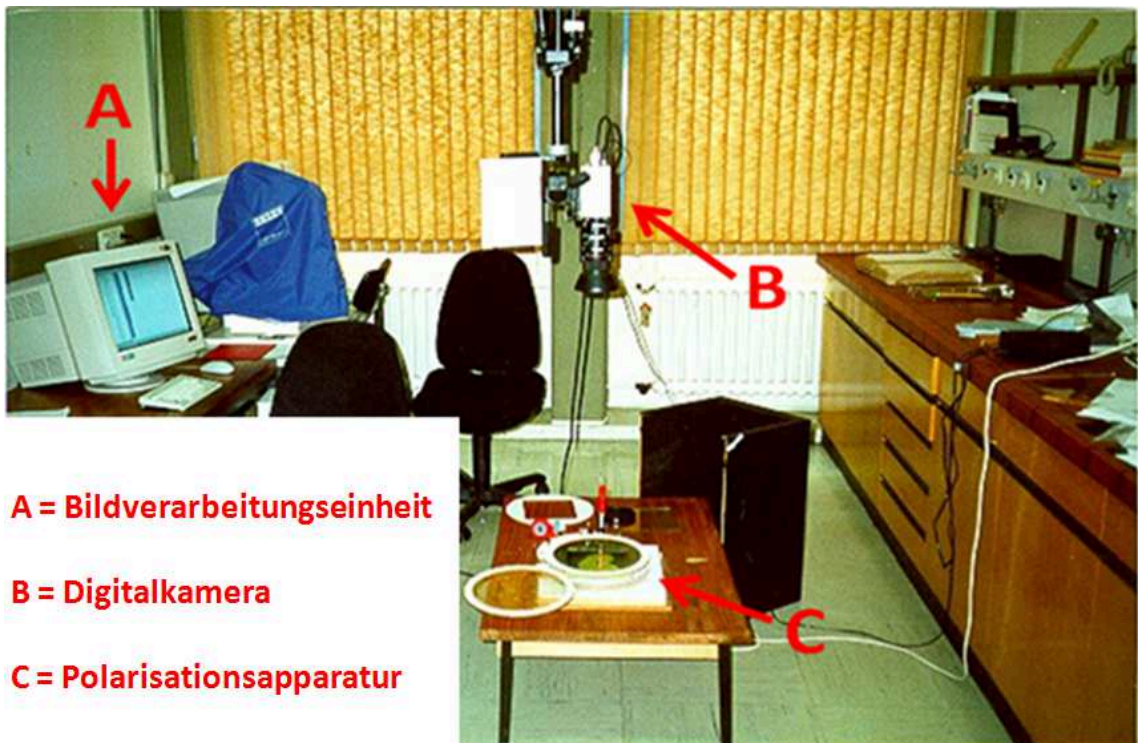


Abb. 24: Gesamte Polarisationsapparat

Im ersten Schritt erfolgte die Digitalisierung unter Rotation der Filterkombination von 0° bis 80° bei jeweils 10° Winkelveränderung. Damit wurden neun Bilder erzeugt. Anhand der jeweiligen Helligkeitsänderungen wurde die Neigung ausgesuchter Faserbahnen berechnet (in der z-Richtung d.h. über die Dicke des Präparats).

Im zweiten Schritt wurden wiederum neun Bilder digitalisiert, diesmal jedoch unter Rotation der Filterkombination von 0° bis 160° und bei jeweils 20° Winkelveränderung. Technisch gelang dies durch Verwendung der zusätzlich in die Filterkombination eingeschobenen Viertelwellenplatte ($\lambda/4$). Damit konnten alle Richtungen der Fasern (von 0° bis 180°) eindeutig und unabhängig voneinander dargestellt werden (xy-Achse). Unter Rotation dieser Filterkombination wurden von jedem einzelnen Kryostatschnitt Sequenzen von neun polarisationsoptischen Bildern erzeugt, in denen die Faserorientierung im Präparat sichtbar wurde.

4.4 Berechnung der Faserorientierung und Erstellen von Faserorientierungskarten

Zur automatisierten Berechnung der Faserorientierung wurde ein Algorithmus verwendet, der mit dem Programm MATLAB 6.0 (MathWorks Inc., Natick, MA, USA) programmiert wurde. Aus den maximalen Grauwerten der Polarisationsbilder (ohne Verwendung der Viertelwellenplatte) lässt sich die Faserneigung von 0 bis 90° berechnen. Aus dem Winkel am Grauwertminimum der Polarisationsbilder (mit Verwendung der Viertelwellenplatte) lässt sich die Faserrichtung von 0 bis 180° berechnen. Somit lassen sich für jeden Punkt im Präparat zwei Parameter ermitteln, die einen Vektor beschreiben, der die Orientierung des Nervenfaserverlaufs in jedem Punkt des Präparats wiedergibt. Alle errechneten Faserverläufe wurden durch das Programm in einer so genannten Faserorientierungskarte zusammengefügt.

4.5 Darstellung der Neigungs- und Richtungswinkel der Nervenfasern in Graustufen und RGB-Farben

Um die 3D-Faserorientierung in nur einem Bild sichtbar zu machen (Abb. 30; 31), wurden die Winkel (Neigungs- und Richtungswinkel) in Vektoren mit x-, y- und z-Koordinaten umgewandelt. Diese konnten in den Farben rot (R), grün (G) und blau (B) als R-, G- und B-Farben in einem farbigen Bild dargestellt werden. Von links horizontal nach rechts verlaufende Fasern erschienen rot. Fasern, die von oben vertikal nach unten verlaufen, erschienen grün, solche die von vorne axial nach hinten verlaufen, erschienen blau.

4.6 Ausrichtung der Faserorientierungskarten

Zur Ausrichtung der Faserorientierungskarten wurde jeder Schnitt am jeweils vorausgehenden Schnittbild durch Drehen und Verschieben zu einer optimalen „Fit-Position“ justiert. Für diese Justierung wurden hauseigene Algorithmen in MATLAB 6.0 (MathWorks Inc., Natick, MA, USA) programmiert. Das Kriterium für eine optimale „Fit-Position“ von aufeinander folgenden Gewebeschnitten war die maximale Übereinstimmung ihrer Faserstrukturen und deren Verlaufsrichtung. Zur Verfügung standen mehrere Methoden, die eine automatische Ausrichtung von Kartenbildern erlauben: Methode des Fiducial Markers, Methode der Consistent Matrix Correlation, Methode des Kreuzkorrelationskoeffizienten, Methode des maximal überlappenden Flächeninhalts, Methode der hauptaxialen Ausrichtung, Methode der Euklidischen Distanz. Um eine optimale Schnittausrichtung zu erreichen (Fit-Kriterium), testeten wir die Methoden der Consistent Matrix Correlation, der Kreuzkorrelationskoeffizienten und der Euklidischen Distanz (Tab.1). Eine optimale Justierung ergab sich mit der Methode der Euklidischen Distanz. Die Methode der Consistent Matrix Correlation führte demgegenüber zu fehlerhafter Rotation und Lateralverschiebung der Gewebeschnitte, während die Methode

der Kreuzkorrelationskoeffizienten lediglich eine Rotation der Gewebeschnitte zur Folge hatte (Abb. 25).

Consistent Matrix Correlation

$$D = \sum_i^n \frac{(I_{A_i} - I_{B_i})}{C_i}$$

with

$$C_i = \max\left(\frac{I_A}{I_B}, \frac{I_B}{I_A}\right)$$

Minimum

Kreuzkorrelationskoeffizient

$$C = \frac{\sum_x \sum_y A(x, y) * B(x, y)}{\sqrt{\sum_x \sum_y A(x, y)^2} * \sqrt{\sum_x \sum_y B(x, y)^2}}$$

Maximum

Euklidische Distanz

$$ED = \sqrt{\sum_i^n (I_{A_i} - I_{B_i})^2}$$

Minimum

Tabelle 1: Angewandte Parameter zur Ausrichtung der seriellen Schnitte

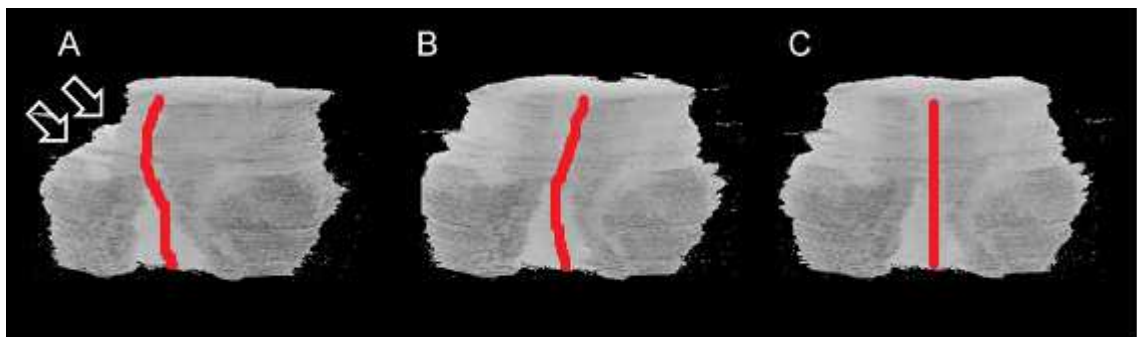


Abb. 25: Rekonstruierte Datenvolumina der Pons

A = Berechnung mittels Kreuzkorrelationskoeffizienten; diese Methode tendiert dazu, die einzelnen Schnitte zu rotieren (Pfeile)

B = Consistent Matrix Correlation; diese Methode tendiert dazu, die einzelnen Schnitte zu Verdrehen

C = Berechnung mittels Euklidischer Distanz führt zu optimaler Justierung der Schnittpräparate und lebensgetreuer Rekonstruktion des Organs

4.7 Segmentierung von Faserbahnen

Die weitere Bearbeitung der justierten Gewebeschnitte erfolgte mit der 3D-Slicer Software (Massachusetts Institute of Technology, USA) und bei reduzierter Bildauflösung von 256 x 256 Pixel. Die Software erlaubte es, dreidimensionale Datensätze darzustellen und zu bearbeiten. Wir benutzten die Software um die Faserbahnen des Hirnstamms der aufeinander liegenden ausgerichteten Gewebeschnitte zu „segmentieren“. Die Segmentierung erfolgte, indem wir in jedem ausgerichteten Schnitt eine ausgewählte Faserbahn manuell farblich markierten. Anschliessend wurden mittels der 3D-Slicer Software die ausgewählten farblich markierten Faserbahnen als dreidimensionales Modell errechnet und im Computer generiert.

5 Ergebnisse

5.1 Faserverlauf im Hirnstamm

258 axiale Serienschnitte eines menschlichen Hirnstamms werden neunmal mit gekreuzten Polarisatoren und neunmal bei eingeschobener Viertelwellenplatte abgelichtet und digitalisiert. Insgesamt werden somit Daten aus 4644 Bildern erhoben. Jedes Bild liefert Neigungskarten (Abb. 26, 27), Richtungskarten (Abb. 28, 29) und ein RGB-Bild (Abb. 30, 31).

Aus der Messreihe der gekreuzten Polarisatoren ohne zusätzliche Viertelwellenplatte wird die Faserneigung von $0^\circ - 90^\circ$ identifiziert (z-Richtung des Hirnschnittes). Das Ergebnis der Untersuchung zeigt beispielhaft Abbildung 26. Sie zeigt die Faserneigung im Hirnstamm auf Höhe des mittleren Pons bei einem Rotationswinkel von 50° . Die Helligkeitsstufen entsprechen der Faserneigung. Die *Fibrae pontis transversae* (E) erscheinen dunkel. Sie verlaufen latero-lateral und somit parallel zur X-Achse. Die Fasern des *Tractus spinocerebellaris anterior* (B) erscheinen als mitteldunkles Areal entsprechend einem Verlauf von cranio-ventral nach caudo-dorsal. Diese Fasern verlaufen schräg in der YZ-Ebene. Die Fasern des *Lemniscus medialis* (D) treten hell hervor aufgrund eines cranio-caudalen Verlaufs und somit parallel zur Y-Achse.

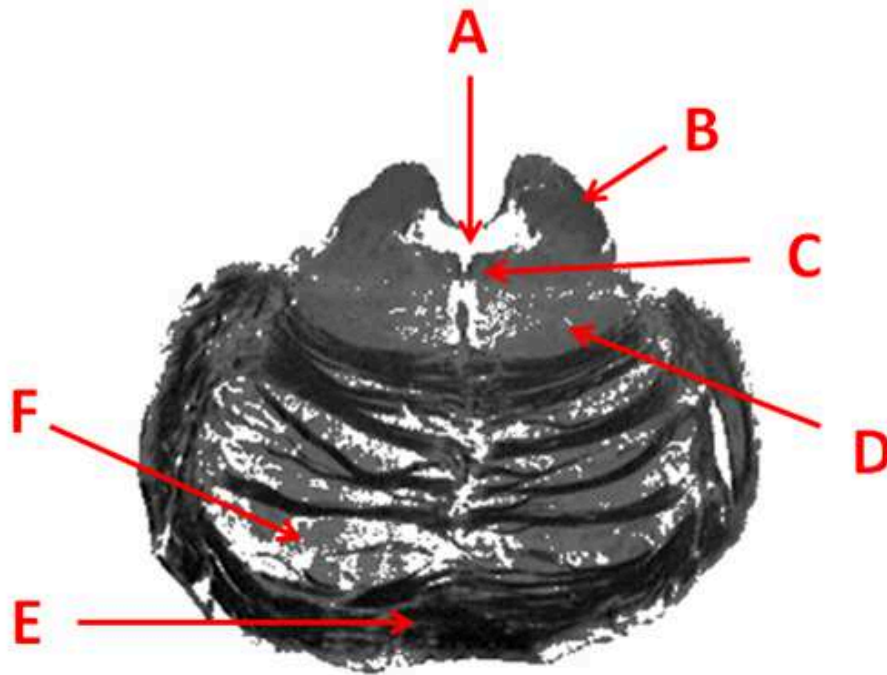


Abb. 26: Faserneigungskarte, Vergrößerung mit Rotationswinkel von 50°

Abbildung 26 zeigt einen vergrößerten Querschnitt im Bereich der Pons. Zu sehen sind die ausgewählten angezeigten anatomischen Strukturen: A) Ventriculus quartus, B) Tractus spinocerebellaris anterior, C) Fasciculus longitudinalis medialis, D) Lemniscus medialis, E) Fibrae pontis transversae, F) Fibrae pontis longitudinales.

In Abbildung 27 ist die pontine Scheibe in eine vollständige Aufnahmeserie von neun Bildern bei einer Rotationswinkelabweichung von jeweils 10° dargestellt. Bei jeder Winkeleinstellung ändern sich die Helligkeitsstufen der Fasern entsprechend dem Faserverlauf. Die Helligkeitsunterschiede innerhalb einer Schnittserie sind relativ klein.



Abb. 27: Faserneigungskarten des Hirnstamms

Aus der Messreihe der gekreuzten Polarisatoren bei eingeblendeter Viertelwellenplatte wird die Faserrichtung von 0° – 180° in der xy-Ebene des Hirnschnittes ermittelt. Abbildung 28 gibt die Faserrichtung im Hirnstamm auf Höhe des mittleren Pons bei einem Rotationswinkel von 160° wieder. Sichtbar sind wie in Abbildung 28 die latero-lateral verlaufenden pontinen Fasern (Fibrae pontis transversae, B) sowie der Lemniscus medialis (D) und die longitudinal (cranio-caudal) verlaufenden Fibrae pontis longitudinales (C). Alle Bahnen erscheinen in abgestufter Helligkeit.

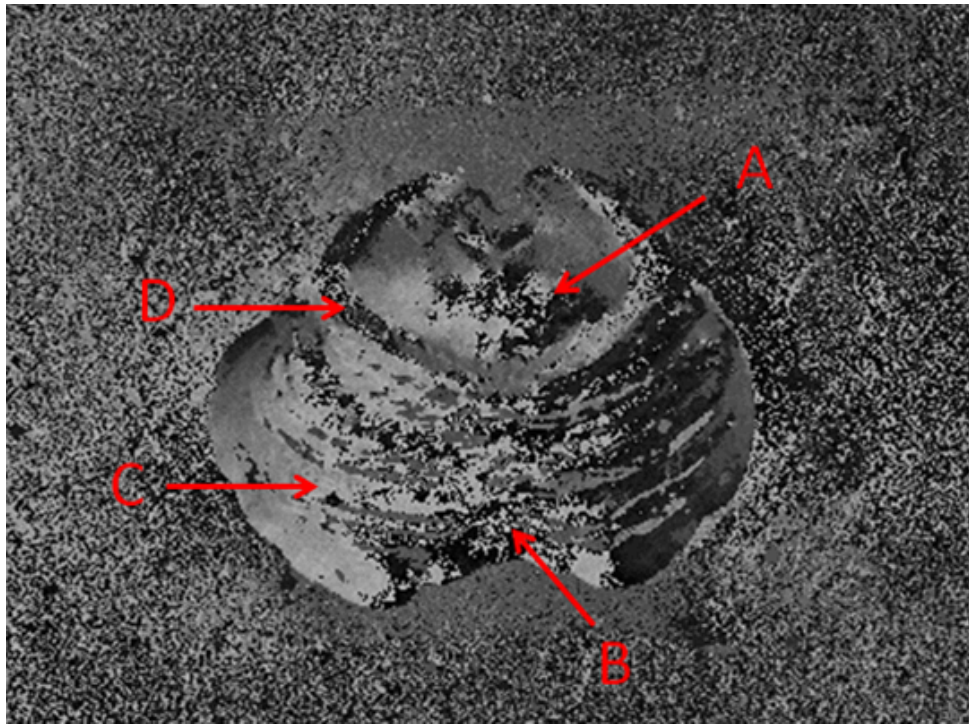
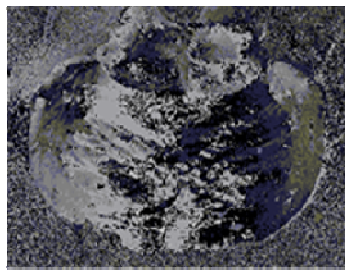


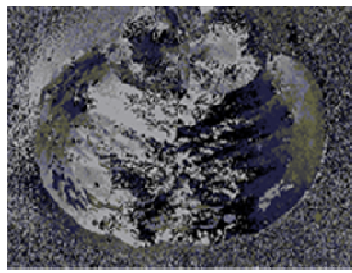
Abb. 28: Vergrößerung einer Faserrichtungskarte des Hirnstamms mit einem Rotationswinkel von 160°

Abbildung 28 zeigt ebenfalls einen vergrößerten Querschnitt im Bereich des Pons. Zu sehen sind die ausgewählten angezeigten anatomischen Strukturen: A) Formatio reticularis, B) Fibrae pontis transversae, C) Fibrae pontis longitudinales, D) Lemniscus medialis.

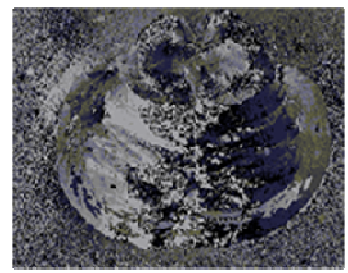
Abbildung 29 gibt die pontine Scheibe in vollständiger Aufnahmeserie von neun Bildern bei eingeschobener Viertelwellenplatte und einer Rotationswinkelabweichung von jeweils 20° wieder. Bei jeder Winkeleinstellung ändert sich die Graustufe der Fasern entsprechend der Faserrichtung. Die Grauton-Unterschiede innerhalb einer Schnittserie sind relativ geringfügig.



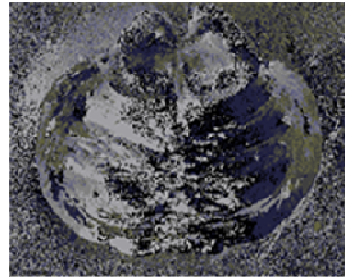
0°



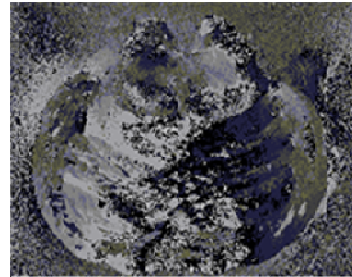
20°



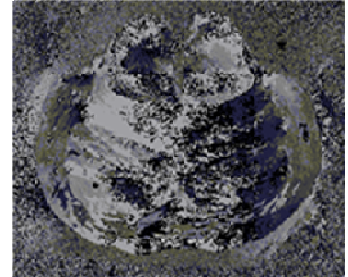
40°



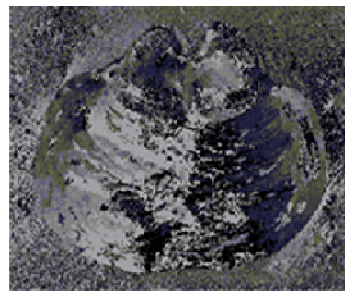
60°



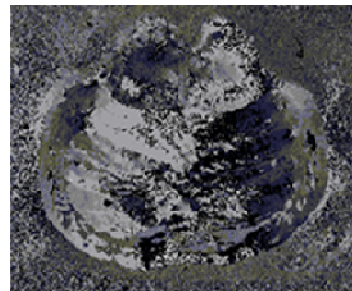
80°



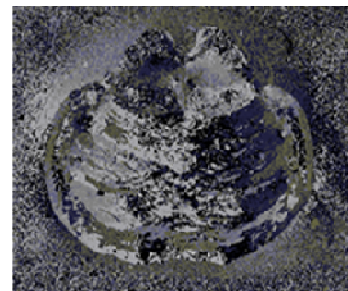
100°



120°



140°



160°

Abb. 29: Faserrichtungskarten des Hirnstamms

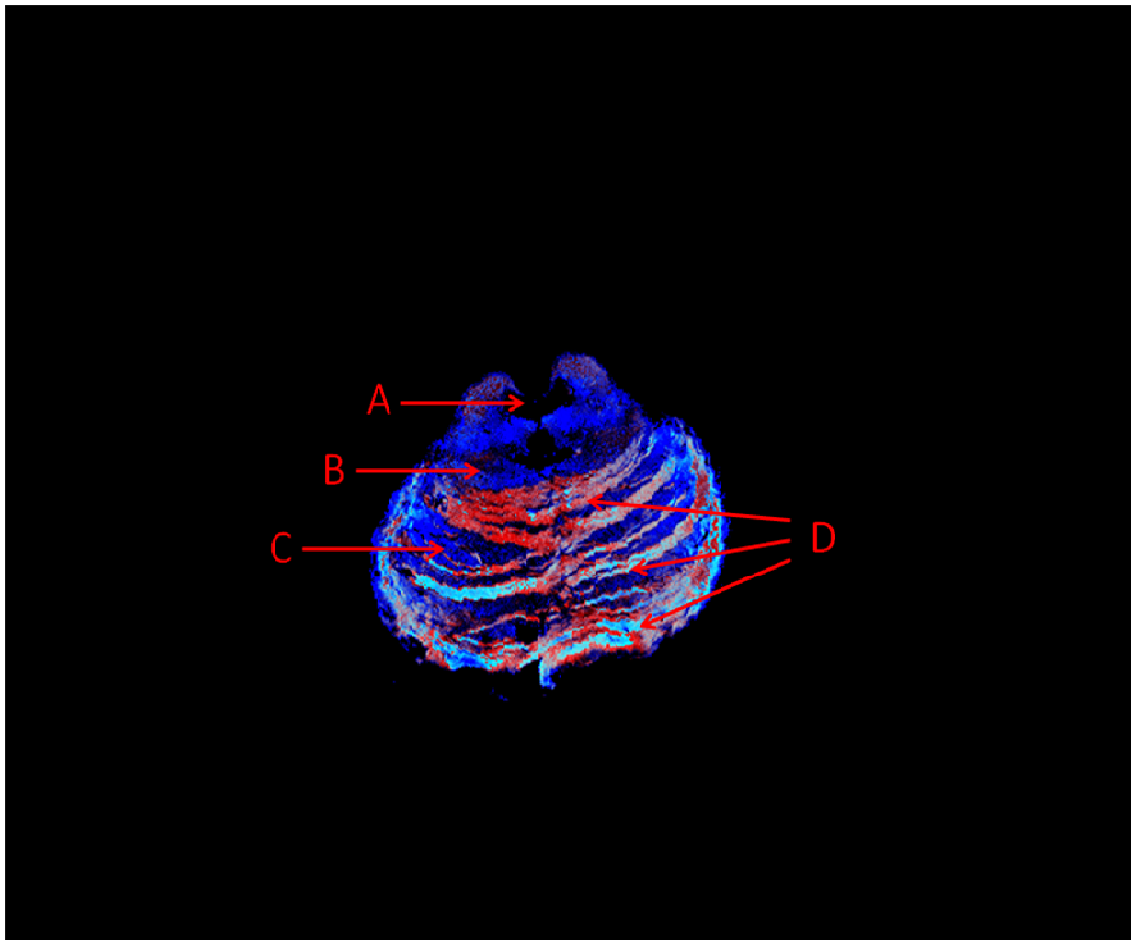


Abb. 30: Vergrößerung einer R-, G-, B-Karte des Hirnstamms

Abbildung 30 zeigt einen vergrößerten Querschnitt im Bereich des Pons. Zu sehen sind die ausgewählten angezeigten anatomischen Strukturen: A) Ventriculus quartus, B) Lemniscus medialis, C) Fibrae pontis longitudinales, D) Fibrae pontis transversae.

Abbildung 31 zeigt die Faserorientierung auf neun RGB-Bildern. Dafür wurden die Neigungs- und Richtungswinkel in Vektoren mit x-, y- und z-Koordinaten umgewandelt. Diese konnten dadurch in den Farben rot (R), grün (G) und blau (B) dargestellt werden. Von links horizontal nach rechts verlaufende Fasern, also in der x-Ebene, erschienen rot. Fasern, die von oben vertikal nach unten verlaufen, also in der y-Ebene, erschienen grün, solche die von vorne axial nach hinten verlaufen, also in der z-Ebene, erschienen blau.

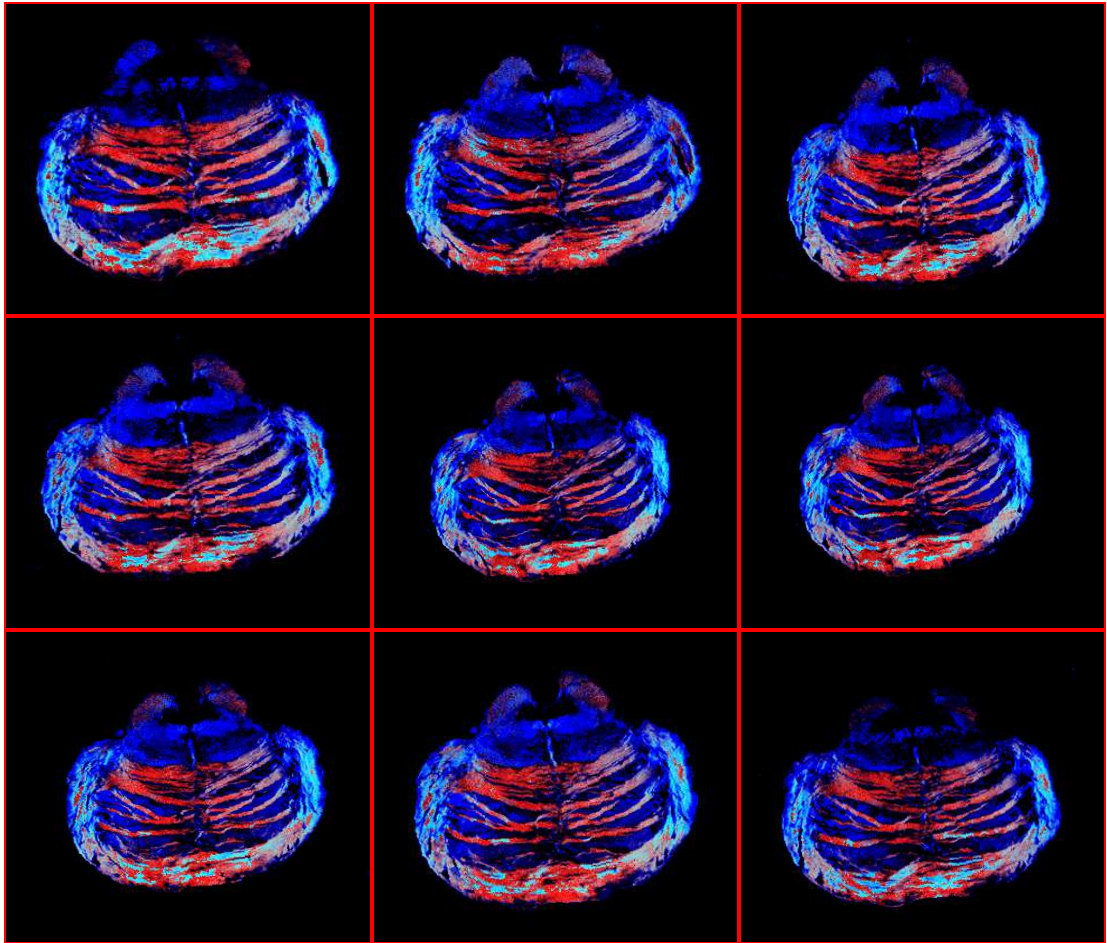


Abb. 31: RGB-Karten des Hirnstamms

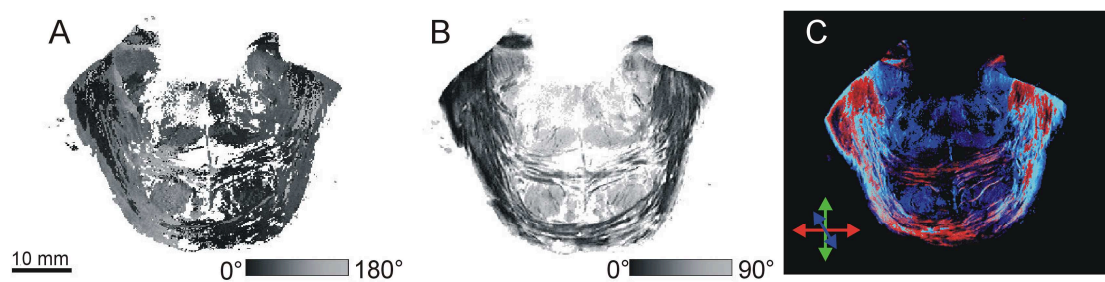


Abb. 32: Faserorientierungskarten eines Schnittes durch den Pons

(A) Faserrichtungskarte. Richtungswinkel sind als Grauwerte sichtbar (s. Grauwertskala, Polarisationswinkel 0° – 180° , xy-Ebene).

(B) Faserneigungskarte. Neigungswinkel (s. Grauwertskala, Polarisationswinkel 0° – 90° , z-Ebene) sind als Helligkeitsstufen sichtbar.

(C) RGB-kodierte Faserorientierungskarte.

5.2 3D-Rekonstruktion der Hirnstammfasern

Nach der Darstellungung ausgesuchter Faserbahnen in Neigungs- und Richtungskarten sowie in RGB-Bildern wird der Hirnstamm dreidimensional rekonstruiert (Abb. 33). In diesem Verfahren werden die Faserbahnen in ihrer räumlichen Zuordnung aufgezeigt.

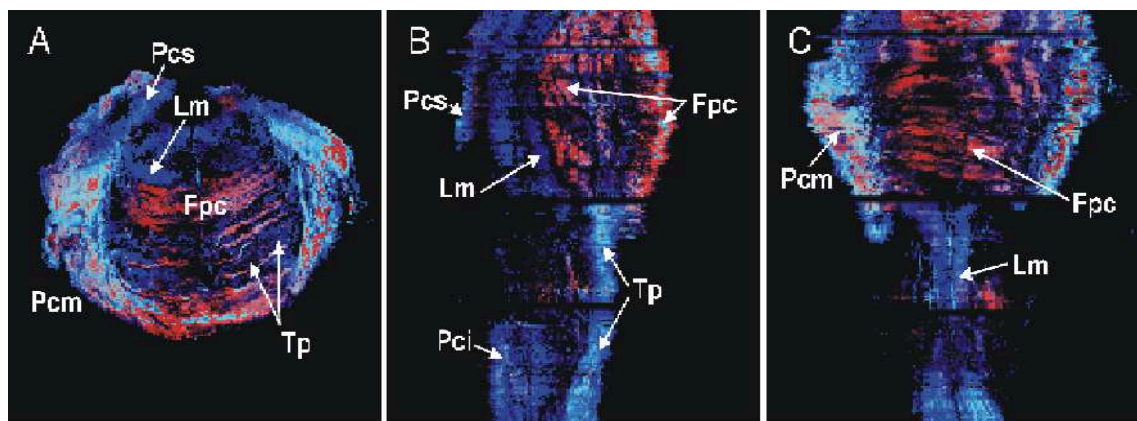


Abb. 33: Dreidimensionaler Datensatz des Hirnstamms

(A) Axialer Schnitt durch den Pons

(B) Sagittaler Schnitt durch Pons und Medulla oblongata

(C) Koronarer Schnitt durch Pons und Medulla oblongata

Abbildung 33 gibt die dreidimensionale Rekonstruktion des Hirnstamms nach justiertem Zusammenfügen aller Serienbilder wieder. Die Justierung der Gewebescheibe erfolgt mit Hilfe der Euklidischen Distanz Methode. Die

Aufeinanderstappeling der Gewebescheiben bleibt sichtbar. Die größeren Spalten in der Sagittalan­­sicht (B) und der Koronaransicht (C) des rekonstruierten Hirnstamms bezeichnen die Separationsschnitte zur Unterteilung des ursprünglich frischen Hirnstamms in ein Zentimeter dicke Blöcke. Die Faserbahnen sind farblich markiert. Sie bezeichnen z.B. den Pedunculus cerebellaris superior (Pcs), den Lemniscus medialis (Lm), die Fibrae pontocerebellares (Fpc), den Pedunculus cerebellaris medius (Pcm), den Tractus pyramidalis (Tp) sowie den Pedunculus cerebellaris inferior (Pci).

Nach Einlesen aller Datensätze in den 3D-Slicer und manueller Segmentierung der Faserbündel erscheinen die meisten Faserbahnen als feste kompakte Bündel (Abb 34). Dadurch werden zugleich ihr Verlauf sowie ihre räumliche Zuordnung sichtbar. Deutlich sind die pyramidalen Bündel von den pontocerebellären Fasern durchzogen (Abb. 33 A). Abbildung 33 B zeigt in medianer Position die Decussatio lemniscorum und die ipsilateral verlaufenden Fasern des Tractus spinothlamicus. Die Kreuzung dieser Fasern wird erst auf spinaler Ebene erfolgen.

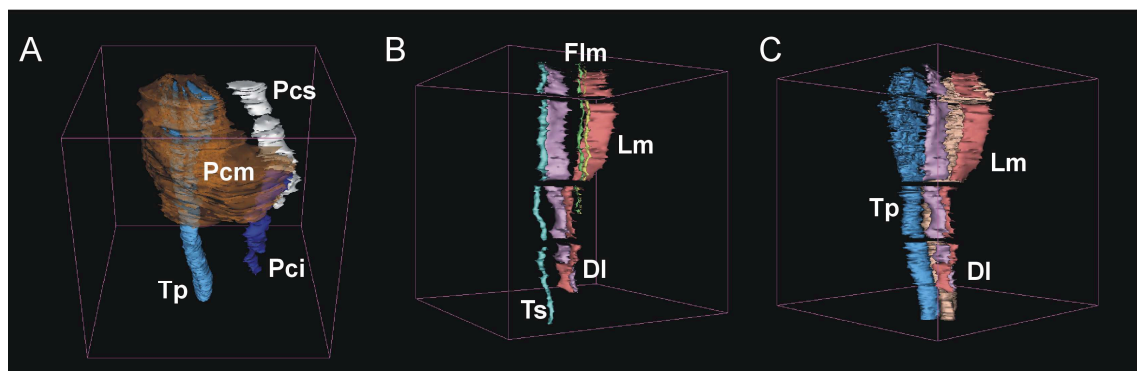


Abb. 34: 3D rekonstruierte Modelle der Hauptfaserbahnen des Hirnstamms

(A) Pedunculi cerebellares

(B) Lemniscus medialis, Decussatio lemniscorum, rechter Tractus spinothlamicus und Fasciculus longitudinalis medialis

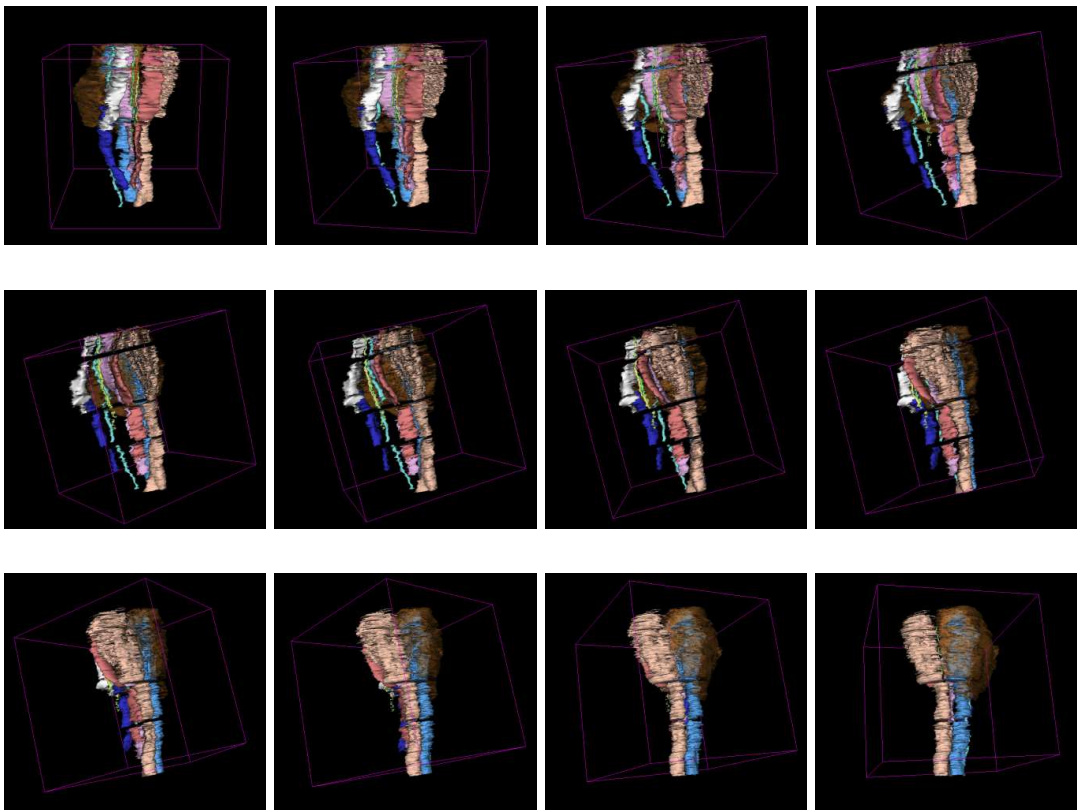
(C) Lemniscus medialis und pyramidale Bahnen

Abkürzungen:

Pcs: Pedunculus cerebellaris superior; Pcm: Pedunculus cerebellaris medius; Pci: Pedunculus cerebellaris inferior; Lm: Lemniscus medialis; DL: Decussatio lemniscorum; Ts: Tractus spinothalamicus; Tp: Tractus pyramidalis; Flm: Fasciculus longitudinalis medialis.

Im Folgenden ist das zusammenfassende Ergebnis aller Faserrekonstruktionen dargestellt. Im dreidimensional rekonstruierten Hirnstamm sind die verschiedenen Nervenfaserbahnen durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet (Abb. 35).

Dieses Hirnstamm-Modell ist im CD-Format in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Jena hinterlegt.



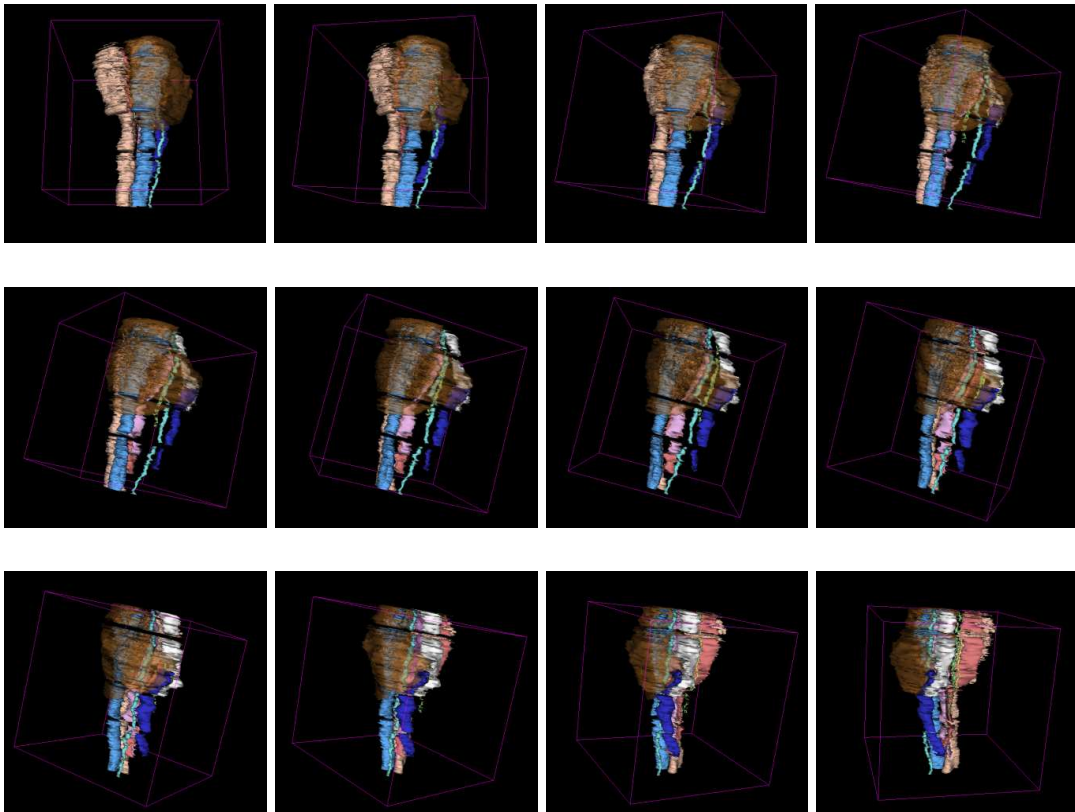


Abb. 35: 3D-rekonstruierte Nervenfaserbahnen

Dunkelblau: Pedunculus cerebellaris inferior, Hellblau: Pyramidenbahn, Rot: Lemniscus medialis, Braun: Pontocerebelläre Fasern, Gelb: Fasciculus longitudinalis medialis, Türkis: Tractus spinothalamicus, Weiß: Pedunculus cerebellaris superior

6 Diskussion

6.1 Brain Mapping

Unter „Brain Mapping“ versteht man die zeichnerische, photographische und heute auch elektronisch digitalisierte Zuordnung von Funktion und Struktur im Gehirn. Brain Mapping verfolgt u.a. das Ziel, Karten definierter zerebraler Funktionsgebiete zur neurochirurgischen Anwendung zu erstellen. In der Einleitung dieser Arbeit wird auf geschichtliche Entwicklungsschritte des Brain Mapping eingegangen. Die histologisch deskriptiven Anfänge der Hirnkartierung waren schematische Darstellungen, die trotz hoher Genauigkeit den Schritt zur heute erforderlichen Handhabung im dreidimensionalen Raum nicht befriedigend vollziehen konnten (Gall, Fritsch, Hitzig, Broca, Brodmann, Penfield...). Erst die Entwicklung des Neuroimaging (CT, MRT, fMRT, PET) gestattet uns, neurologische und psychiatrische Erkrankungen detaillierter darzustellen und neurochirurgische Eingriffe punktgenau vorzunehmen (Cellerini et al., 1997; Rye, 1999). Neuronale Netzwerke werden über Nuclei der kortikalen und subkortikalen Hirnbereiche gebildet, die über kurz- und lang-Distanz Faserbahnen vernetzt sind. Um die Funktion dieser neuronalen Netzwerke auch weiterhin besser verstehen zu können, ist es unentbehrlich ihre anatomischen Verbindungen zu kennen. Doch alle bisherigen Methoden, die hier aufgezeigt wurden, haben ihre Grenzen. So erweist sich eine detaillierte Kartierung der verdichteten Nervenfaserbündel der weißen Hirnsubstanz im erwachsenen menschlichen Gehirn als problematisch, unter anderem durch das Fehlen von spezifischen Markern von lang-Distanz gegenüber kurz-Distanz Fasern (Schmahmann und Pandya 2009). Wenngleich somit Brain Mapping nicht grundsätzlich neu ist, so ist doch die zunehmende Genauigkeit die Grundlage für den heute erreichten Standard in Diagnostik, Therapie und Nachbehandlung.

6.2 Zur Polarisationsstechnik

Die in dieser Arbeit entwickelte polarisationsoptische Methode zur Darstellung intracerebraler Leitungsbahnen führt gegenüber den herkömmlichen Kartierungsmethoden zu wesentlich höherer Strukturauflösung. Mit der hier eingesetzten Polarisationsmikroskopie wird eine Auflösung von $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$ erreicht, durch Modifikation der Optik dürfte die Auflösungskraft noch verbesserungsfähig sein. Als limitierenden Faktor nennen Axer et al. (2001) jedoch eine Präparatschnittdicke von ca. $100 \mu\text{m}$. Beträgt die Schichtdicke $120 \mu\text{m}$ und mehr kommt es zur Überlagerung von Polarisationsseffekten. Liegt die Schichtdicke des Präparats unter $80 \mu\text{m}$, so wird die Lichtintensität und damit der Kontrast so gering, daß mit dem gegenwärtigen Computerprogramm die Faserneigung nicht mit ausreichender Genauigkeit berechnet werden kann.

6.3 Untersuchungen am Großhirn

Das Polarized Light Imaging (PLI) (Larsen et al. 2007) stellt heute eine potente Methode dar, um die Orientierung von Nervenfasern im Gehirn hochauflösend wiederzugeben (Axer et al. 2011). Mit dem PLI ist es nunmehr möglich, einen detailgetreuen 3D-Hirnatlas zu erstellen. In einer vorangehenden Dissertation konnte bereits Mürköster (2013) die Faserarchitektur von Teilen des Großhirns beschreiben. Axer et al. (2011) analysierten das Cingulum mit seinen assoziativen Bahnen sowie die Faserverbindungen des Sprachzentrums (Axer et al. 2012). Erwähnt seien diese Studien deshalb, weil in ihnen präzise Daten zu den vorderen Leitungsbahnen des Sprachnetzwerkes unter Zuhilfenahme der PLI gewonnen wurden. Das klassische anatomische Konzept der Sprachbahnen umfasst die Verbindung zwischen der temporo-sensorischen Region, dem sog. Wernicke Areal, und dem fronto-motorischen Kortex, dem sog. Broca Areal, über den Fasciculus arcuatus (dorsale Leitungsbahn) (Geschwind 1970). Moderne Konzepte sprechen heute von der klassisch dorsalen Leitungsbahn, welche bei Wort- und Satzwiederholungen aktiviert wird, und einer zweiten Bahn, der ventralen Leitungsbahn, welche über die

Capsula extrema verläuft und bei auditorischen Wahrnehmungen aktiviert ist (Saur et al. 2008). Somit steht die dorsale Leitungsbahn für die Integration einer sensorischen Empfindung und die ventrale Leitungsbahn für die Umwandlung von Geräuschen in deren Verständnis und Bedeutung (Weiller et al. 2011). Weiller und Co-Autoren interpretieren zusammenfassend die Bedeutung der strukturellen Fasersysteme der weißen Substanz, die mit den sprach-sensitiven Arealen in Zusammenhang stehen. PLI-Untersuchungen von Axer et al. (2012) beschreiben den Hauptfasertrakt der dorsalen Leitungsbahn als den Fasciculus arcuatus und den Hauptfasertrakt der ventralen Leitungsbahn als den Fasciculus fronto-occipitalis inferior. Als eines der Hauptprobleme in der Darstellung der Faserbahnen erweist sich, daß weder das Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging (DT-MRI), noch die Faserdissektionstechnik den exakten Anfang und das exakte Ende dieser Fasern in der grauen Substanz beschreiben können. Dies ist jedoch im Affenhirn mit der anatomischen Tract-tracing Methode möglich (Yeterian et al. 2012). Naturgemäß ist diese Technik aber im Gehirn eines Patienten nicht anwendbar, da Tracer appliziert und über aktive axonale Transportmechanismen in die durch Nervenfasern verbundenen Gebiete transportiert werden müssten. Somit lassen sich lediglich tierexperimentelle Ansätze realisieren. Derartige Verbindungen zwischen mehreren Funktionsgebieten über strukturelle Signalübertragungswege werden als Konnektome bezeichnet und sind Gegenstand von PLI-Untersuchungen (Axer et al. 2010). Aktuell wird versucht, Nervenfaserverbindungen, die sowohl in der grauen als auch in der weißen Hirnsubstanz verlaufen, zu erfassen und zu kartieren.

Die Capsula externa besteht aus Faserbahnvereinigungen zwischen dem Claustrum und dem insulären Kortex. Neuere fMRI und DT-MRI haben gezeigt, daß einige dieser Faserbahnen in die funktionellen Aufgaben des Sprachsystems involviert sind (Saur et al. 2008), und es wurde die PLI herangezogen, um diese spezifische Hirnregion näher zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen seitenabhängige Asymmetrien in den Gehirnen, die sich zudem als geschlechts- und altersspezifisch erwiesen. Dieser Befund hätte mittels DTI nicht aufgezeigt werden können, da dessen niedrige Auflösung lediglich die Darstellung großer Fasertrakte wie der Pyramidenbahn zuläßt.

Ein besonderes, der PLI und gegebenenfalls der CLSM zur Klärung vorbehaltenes Problem, stellt sich im ZNS, wo sich die Faserbahnen der weißen Substanz in besonderer Dichte durchdringen. Eine kritische Region bezeichnet der Übergang von der weißen zur grauen Substanz mit diffuser Durchmischung der Nervenfasern. Es darf in dieser Lokalisation, wie auch im subcortikalen Weiß, jedoch nicht übersehen werden, daß sich Teile des Fasersystems auch der PLI-Untersuchung entziehen, sobald nämlich ihre Myelinscheide fehlt. Eingehende Untersuchungen von Ciccarelli et al. (2008) zeigen, daß die Darstellung der Bahnen des cerebralen Cortex in Hochauflösung das Verständnis neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen wesentlich erweitert. Aufzeigen der dreidimensionalen Architektur der weißen Hirnsubstanz ist somit ein medizinisch wichtiges Ziel, um neurokognitive Prozesse besser zu verstehen.

Als komplexe Struktur erweist sich neben der corticalen weißen Substanz weiterhin die Fasermasse der Capsula interna, in der eine Vielzahl kreuzender Fasertrakte verlaufen und die insofern eine Art Flaschenhals darstellt. Bei Untersuchungen der Architektur von Nervenfasern an verschiedenen Punkten der Capsula interna wurde ergänzend zur PLI die hochauflösende Konfokale Lasermikroskopie (CLSM) verwendet.

Erwähnt seien schließlich Untersuchungen von Larsen et al. (2007). Diese Autoren identifizieren im Detail die Richtung einzelner Fasern in definierten thalamischen Kernen, in verschiedenen kortikalen Gebieten, in der Commissura anterior, dem Fornix und der Capsula interna.

6.4 Zum Hirnstammmodell

Das vorgestellte Modell des menschlichen Hirnstamms komplettiert den konzipierten Faseratlas. Anders als bei der Faserbestimmung im Großhirn wurde der Aufgliederung der Fasern im Hirnstamm mit der PLI Methode bisher wesentlich weniger Aufmerksamkeit geschenkt. In der vorliegenden Studie ließ sich zeigen, daß mit polarisiertem Licht erzeugte Bilder nach digitaler

Bearbeitung Faserorientierungsmappen liefern, die auch kleine Faserbündel erkennen lassen. Die Faserbahnen des Telencephalons erweisen sich allerdings als so stark vermischt, daß die Identifizierung ihrer Gliederung selbst nach Anwendung der PLI ein Problem bleibt.

Zur Erleichterung und Automatisierung der Zuordnung kleiner Faseranteile als Untereinheiten größerer Bahnen werden weitere als die bereits aufgezeigten Algorithmen benötigt. Die Auflösung der Daten muß weiter erhöht werden, um letztlich auch sehr kleine Faserbündel zu erfassen.

Die der Arbeit als CD beiliegende 3D-Animation des Hirnstammmodells gestattet neben der Raumausrichtung auch die Substraktion einzelner Faserbahnen, so daß kleine Fasern im Bild stehen bleiben und isoliert sichtbar gemacht werden können.

Die für die Computeranimation angefertigten Bilder besitzen gegenwärtig eine Größe von 760 x 574 Pixeln. Die Auflösung zum Import der Datensätze in den 3D-Slicer musste jedoch auf 256 x 256 Pixel reduziert werden. Somit bedarf es einer Verbesserung der computerbasierten Speicher- und Rechenkapazitäten, um die Auflösung zu steigern.

6.5 Vergleichende Betrachtung von PLI, Diffusionsgewichtetem Imaging (DWI) und Diffusion Tensor Imaging (DTI)

Auch mit 3D-PLI werden gekreuzte und sich berührende, kurze und lange Bahnen detailgetreu dargestellt. Die 3-D Darstellung basiert auf einem Volumenelement von 100 μm^3 Isotropie oder kleiner. Definierte Hirnregionen werden dazu in kleinste Faserkreuze gefasst, sodaß eine bisher nicht erreichte Auflösung erreicht wird.

Es gelingt die Auflösung von Fasertrakten im Submillimeterbereich. Z.B. konnte dadurch in den Volumenatlanten die altersbedingte Volumenabnahme der Pyramidenbahn gezeigt werden. Das Volumen des Lemniscus medialis blieb

jedoch konstant (Axe et al. 2011). Nachteilig bleibt die Anwendbarkeit nur in postmortalem Gewebe, dafür aber verspricht die PLI Vorteile zum Validieren und Kalibrieren von DTI-MRT und DSI (Diffusion spectrum imaging)- Techniken (Lin et al. 2003, Kinoshita et al. 2005).

Hirnstamm-Analysen mittels PLI zeigen, daß es möglich ist, kompakte Faserbahnen zu vermessen. Mit der Diffusion-MRT ist dies ebenfalls möglich, wie z.B. bei der Darstellung der Wallerschen Degeneration der Pyramidenbahn nach Schlaganfällen (Grassel et al. 2010). Allerdings ist sie in der Darstellung kleinerer Fasertrakte, wie z.B. des Lemniscus medialis, ungenau.

Wie die PLI vermag auch das diffusionsgewichtete MRT Informationen zum dreidimensionalen Verlauf der Hauptfaserbahnen des Gehirns zu liefern (Mori et al. 1999). Jüngst vorgestellte MR-basierte Methoden (DTI, HARDI) wurden an Probanden erprobt und sollten im Submillimeterbereich sich kreuzende (crossing) und sich vermischende (kissing) Faserbahnen detektieren (Schmahmann et al. 2007, Naidich et al. 2008, Johansen-Berg and Rushworth 2009). Diese Methoden weisen jedoch eine relativ niedrige räumliche Auflösung der Diffusionsbildgebung auf. Die 3D-Polarisationsmethode hingegen liefert bereits Nervenfaserkarten, die im Submillimeterbereich zu detektieren sind (Axe et al. 2011a). Vergleicht man beide Verfahren, so ist zu beachten, daß bei beiden Methoden andere physikalische Prinzipien zugrunde liegen. Während die Polarisationsmethode einen Vektor aufgrund der optischen Eigenschaften des Gewebes generiert, arbeitet die Diffusionstensorbildgebung (DTI) mit einem Tensor und einem Haupteigenvektor in Richtung der größten Diffusion, nämlich entlang der Nervenfasern. Sein Verlauf folgt der Hauptfaserrichtung. Die senkrecht zur Faserrichtung verlaufende Diffusion ist dagegen maximal eingeschränkt (Moseley et al. 1990). Man spricht hier von „anisotroper Diffusion“. Demzufolge weisen Faserorientierungskarten eine höhere Auflösung als diffusionsgewichtete Karten oder MRT-Darstellungen auf. Während man mit der Diffusionstensorbildgebung (DT-MRI) unter Nutzung eines Magnetresonanztomographen von 1,5 Tesla eine Auflösung von 1 mm - 5 mm x 10 μm^3 erreicht (Mori und Van Zijl 2002), kann mittels eines hochauflösenden Magnetresonanztomographen von 9,4 Tesla eine maximale Auflösung von 39 x

47 x 47 μm^3 erreicht werden (Mori et al. 2001), allerdings mit extrem langen Scan-Zeiten. Nakada et al. (1999) haben mittels DTI eine Pixelgröße von maximal 469 x 469 μm erreicht. Dem steht bei der Polarisationsmethode eine Auflösung von 100 x 100 μm pro Pixel gegenüber. Die PLI ermöglicht somit eine weitaus größere Auflösung als die DTI. Auf den ausschließlichen post mortem Einsatz wurde bereits verwiesen. Als Vorteil des MRT bleibt somit der mögliche Einsatz am Lebenden, während die PLI genutzt werden kann, um aussagekräftige anatomische Darstellungen der Nervenfaserbahnen zu erhalten. Beide Verfahren sollten daher nicht konkurrierend zueinander stehen, sondern sollten komplementär eingesetzt werden.

Ein weiterer Bereich, der eine hochauflösende Bildgebung fordert, ist die Untersuchung von Bahnen zwischen kortikalen Regionen und subcortikalen Kernen. Eine Methode, um diese Verbindungen zu rekonstruieren, ist das dreidimensionale Fibertracking mit Diffusionstensorbildgebung, die aktuell einzige Möglichkeit der in vivo Darstellung axonaler Bahnen in der weißen Substanz (Kinoshita et al. 2005, Lori et al. 2002, Mori et al. 1999, Stieltjes et al. 2001, Yamada et al. 2003). DTI ermöglicht die Darstellung und Beurteilung pathologischer Prozesse im menschlichen Gehirn, z.B. bei Tumoren oder bei der multiplen Sklerose. Ein wichtiges Anwendungsgebiet ist das so genannte „Brain Shift“, die Faserverschiebung in der Nachbarschaft von Hirntumoren oder Ödemzonen, für das aktuelle Datensätze unmittelbar vor einer Operation erhoben werden müssen. Eingeschränkt ist seine Aussagefähigkeit insofern, als nur wenige Arbeiten zur Validierung der Methode vorliegen (Makris et al. 1997). Unklar blieb bisher, ob eine Änderung des Diffusionsverhaltens der Wassermoleküle auf der Änderung der Nervenfaserdichte, der Myelinscheiden oder der Kombination aus beidem beruht. Ein Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, sowohl der in-vivo als auch der post mortem-Untersuchung (Englund et al. 2004, Larsson et al., 2004). Nachteilig ist die relativ niedrige Auflösung, die kleiner als 1 - 2 mm ist, was die Sichtbarkeit von kreuzenden Faserbahnen oder schmalen Fasertrakten reduziert.

7 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, um die Verlaufsrichtung von Nervenfasern zu analysieren und es wurde beispielhaft ein Nervenfaseratlas vom Hirnstamm des Menschen erarbeitet.

Hierzu wurde eigens eine polarisationsoptische Mikroskopie entwickelt. Zusätzlich wurde die digitale Bildverarbeitung durch Einführung von bildverarbeitenden Algorithmen ermöglicht. Mehrere menschliche Hirnstämme wurden aufgearbeitet und in ein statistisches System integriert. Auf diese Art ließ sich ein Faseratlas mit Informationen über anatomische Variabilitäten, die im Hirnstamm wahrscheinlich weniger ausgeprägt sind als in den Großhirnhemisphären, generieren.

Mit Polarisationsoptik konnten einzelne Nervenbahnen dreidimensional und in Hochauflösung dargestellt werden. Diese Methode kann sowohl zur Validierung als auch zur Kartierung (Brain Mapping) des gesamten Gehirns benutzt werden. Diese Arbeit hat entscheidend zur Entwicklung der PLI und 3D-PLI beigetragen.

Die Methode könnte die Handhabung des Gehirns unter der Operation erleichtern. Die präoperative Darstellung von Nervenfaserverbindungen sollte in der Neurochirurgie einen hohen Nutzwert auch zur Verhinderung schwerwiegender Komplikationen haben.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Agrawal A, Kapfhammer JP, Kress A, Wichers H, Deep A, Feindel W, Sonntag VK, Spetzler RF, Preul MC. 2011. Josef Klingler's models of white matter tracts: influences on neuroanatomy, neurosurgery, and neuroimaging. *Neurosurgery*, 08; 69(2): 238-52.
- Arroyo EJ, Scherer SS. 2000. On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol*, 113: 1-18.
- Axer H. 2001. Funktionelle Fasersysteme in histologischen Serienschnitten menschlicher Gehirne.
- Axer M, Amunts K, Grässel D, Palm C, Dammers J, Axer H, Pietrzyk U, Zilles K. 2011a. A novel approach to the human connectome: ultra-high resolution mapping of fiber tracts in the brain. *Neuroimage* 54, 109-570.
- Axer H, Axer M, Krings T, Keyserlingk DGv. 2001. Quantitative estimation of 3D fiber course in gross histological sections of the human brain using polarized light. *J Neurosci Meth*, 105: 121-131.
- Axer H, Beck S, Axer M, Schuchardt F Heepe J, Flücken A, Axer M, Prescher A, Witte O W. 2011b. Microstructural analysis of human white matter architecture using polarized light imaging: views from neuroanatomy. *Frontiers in Neuroinformatics*, 5, 1-12.
- Axer H, Grassel D, kleiner M, Dammers J, Dieckscheid T, Reckfort J, Hutz T, Eiben B, Pietrzyk U, Zilles K, Amunts K. 2011c. High-resolution fiber tract reconstruction in the human brain by means of three-dimensional polarized light imaging. *Front Neuroinform*, 5: 34.
- Axer H, Keyserlingk DGv. 2000. Mapping of fiber orientation in human internal capsule by means of polarized light and confocal scanning laser microscopy. *J Neurosci Methods*, 94: 165-75.

Axer H, Klingner C M, Prescher A. 2012. Fiber anatomy of dorsal and ventral language streams. *Brain and Language*, 1-13.

Bartholini E. 1669. *Experimenta Crystalli Islandici Disdiaclastici Quibus mira et insolita Refractio detegitur*. Hafniae, Sumptibus Danielis Paulli Reg. Bibl. (Versuche mit dem doppeltbrechenden isländischen Kristall, die zur Entdeckung einer wunderbaren und außergewöhnlichen Brechung führten).

Basser PJ, Mattiello J, LeBihan D. 1994a. Estimation of the effective self-diffusion tensor from the NMR spin echo. *J Magn Reson B*, 103 (3): 247-254.

Basser PJ, Mattiello J, LeBihan D. 1994b. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophys J*, 66(1): 259-267.

Beaulieu C. 2002. The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system – a technical review. *NMR Biomed*, 15 (7-8): 435-455.

Brewster D. 1835. *Populäres, vollständiges Handbuch der Optik*. Nabu Press Verlag, 144f.

Brodmann K. 1909. *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Principien, dargestellt auf grund des Zellenbaues*. Leipzig: Johann Ambrosius Barth Verlag.

Cajal R. 1906. *Vergleichende Strukturbeschreibung und Histogenese der Hirnrinde. Anatomisch-physiologische Betrachtungen über das Gehirn. Struktur der Nervenzellen des Gehirns. Sach- und Namenregister zu Heft 1–5*.

Cellerini M, Konze A, Caracchini G, Santoni M, Dal Pozzo G. 1997. Magnetic resonance imaging of cerebral associative white matter bundles employing fast-scan techniques. *Acta Anat*, 158: 215-221.

Ciccarelli O, Catani M, Johansen-Berg H, Clark C, Thompson A. 2008. Diffusion-based tractography in neurological disorders: concepts, applications, and future developments. *Lancet Neurol*. 7, 715 – 727.

Coremans J, Luytens R, Verhelle F, Stadnik T, Osteaux M. 1994. A method for myelin fiber orientation mapping using diffusion weighted MR images. *Magn Reson Imaging*, 12: 443-454.

- Damasio H. 1995. Human brain anatomy in computerized images. New York: Oxford University Press.
- Dejerine J. 1901. Anatomie des centres nerveux. Paris: Rueff et Cie.
- Douek P, Turner R, Pekar J, Patronas N, Bihan DL. 1991. MR color mapping of myelin fiber orientation. J Comp Assist Tomogr, 15: 923-929.
- Düweke P. 2001. Kleine Geschichte der Hirnforschung, von Descartes bis Eccles. München, C.H. Beck Verlag.
- Englund E, Sjöbeck M, Brockstedt S, Lätt J, Larsson EM. 2004. Diffusion tensor MRI post mortem demonstrated cerebral white matter pathology. J. Neurol. 251, 350-352.
- Friederici AD. 2003. Sprachverarbeitung, der Lauscher im Kopf. Gehirn und Geist. Spektrum der Wissenschaft Verlag, 2: 43-46.
- Fritsch GT, Hitzig E. 1870. Ueber die elektrische Erregbarkeit des Grosshirns. Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin. 3, S. 300-332.
- Geschwind, N. 1970. The organisation of language and the brain. Science, 170, 940-944.
- Gerlach D. 2008. Geschichte der Mikroskopie. Polarisationsmikroskopie. Verlag Harri Deutsch.
- Geyer S, Schleicher A, Zilles K. 1997. The somatosensory cortex of human: cytoarchitecture and regional distributions of receptor-binding sites. Neuroimage, 6 (1): 27-45.
- Grässel, D., Ringer, T. M., Fitzek, C., Fitzek, S., Kohl, M., Kaiser, W. A., Witte, O. W., and Axer, H. 2010. Wallerian degeneration of pyramidal tract after paramedian pons infarct. Cerebrovasc. Dis. 30, 380-388.
- Hecht E. 2009. Optik. Fünfte Aufl. Oldenbourg: Wissenschaftsverlag, 173-179.
- Hüttermann J, Trautwein A, Kreibitz U. 2004. Physik für Mediziner, Biologen, Pharmazeuten. Sechste Aufl. Berlin, New York: De Gruyter Verlag.

- Johansen-Berg H, Rushworth MF. 2009. Using diffusion imaging to study human brain connective anatomy. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 75-94.
- Jones DK, Griffin LD, Alexander DC, Catani M, Horsfield MA, Howard R, Williams SC. 2002. Spatial normalization and averaging of diffusion tensor MRI data sets. *Neuroimage*, 17 (2): 592-617.
- Kinoshita M, Yamada K, Hashimoto N, Kato A, Izumoto S, Baba T, Maruno M, Nishimura T, Yoshimine T. 2005. Fiber-tracking does not accurately estimate size of fiber bundle in pathological condition: initial neurosurgical experience using neuronavigation and subcortical white matter stimulation. *Neuroimage*, 25: 424-429.
- Klingler J. 1935. Erleichterung der makroskopischen Präparation des Gehirns durch den Gefrierprozess. *Schweizer Archiv für Neurologie und Psychiatrie*, 36: 247-256.
- Klingler J, Gloor P. 1960. The connections of the amygdala and of the anterior temporal cortex in the human brain. *J Comp Neurol.*, 115: 333-369.
- Klüver H, Barrera E. 1953. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropath exp Neurol*, 12: 400-403.
- Larsen L, Griffin L. 2004. Can a continuity constraint be used to resolve the inclination ambiguity of polarised light imaging? *Computer Vision and Mathematical Methods in Medical and Biomedical Image Analysis*. Berlin, Heidelberg: Springer, 365-375.
- Larsen L, Griffin LD, Grassel D, Witte OW, Axer H. 2007. Polarized light imaging of white matter architecture. *Microsc Res Tech*, 70 (10): 851-863.
- Le Bihan D, Turner R, Douek P. 1993. Is water diffusion restricted in human brain white matter? An echoplanar NMR imaging study. *Neuroreport*, 4: 887-890.
- Le Bihan D. 1996. Functional MRI of the brain principles, applications and limitations. *J Neuroradiol*, 23 (1): 1-5.

Lin CP, Wedeen VJ, Chen JH, Yao C, Tseng WYI. 2003. Validation of diffusion spectrum magnetic resonance imaging with manganese-enhanced rat optic tracts and ex vivo phantom. *NeuroImage* 19: 482—495.

Lori NF, Akbudak E, Shimony JS, Cull TS, Snyder AZ, Guillory RK, Conturo TE. 2002. Diffusion tensor fiber tracking of human brain connectivity: acquisition methods, reliability analysis and biological results. *NMR Biomed*, 15(7-8): 494-515.

Ludwig E, Klingler L. 1956. *Atlas cerebri humani*, Basel: Karger.

Makris N, Worth AJ, Sorensen AG, Papadimitriou GM, Wu O, Reese TG, Wedeen VJ, Davis TL, Stakes JW, Caviness VS, Kaplan E, Rosen BR, Pandya DN, Kennedy DN. 1997. Morphometry of in vivo human white matter association pathways with diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Ann Neurol*, 42(6): 951-962.

Mesulam MM. 1990. Large-scale neurocognitive networks and distributed processing for attention, language and memory. *Ann Neurol*, 28: 597-613.

Minoshima S, Koeppe RA, Frey KA, Ishihara M, Kuhl DE. 1994. Stereotactic PET atlas of the human brain: aid for visual interpretation of functional brain images. *J Nucl Med*, 35 (6): 949-954.

Minsky M. 1988. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 10 (4): 128—138.

Morell P, Quarles RH, Norton WT. 1989. Formation, Structure and Biochemistry of Myelin. In: Siegel G, Agranoff B, Albers WR, Molinoff P, editors. *Basic Neurochemistry*. 4th ed. New York: Raven Press. Pp. 109-136.

Mori S, Barker BP. 1999. Diffusion magnetic resonance imaging: its principle and applications. *Anat Rec (New Anat)*, 257: 102-109.

Mori S, Crain BJ, Chacko VP, Van ZIJL PCM. 1999. Three-dimensional tracking of axonal projections in the brain by magnetic resonance imaging. *Ann Neurol*, 51: 265-269.

Mori S, Itoh R, Zhang J, Kaufmann WE, van Zijl PC, Solaiyappan M, Yarowsky P. 2001. Diffusion tensor imaging of the developing mouse brain. *Magn Reson Med*, 46 (1): 18-23.

Mori S, Van Zijl PCM. 2002. Fibre tracking: principles and strategies - a technical review. *NMR Biomed*, 15: 468-480.

Moseley ME, Kucharczyk J, Mintorovitch J, Cohen Y, Kurhanewicz J, Derugin N, Asgari H, Norman D. 1990. Diffusion-weighted MR imaging of acute stroke: correlation with T2-weighted and magnetic susceptibility-enhanced MR imaging in cats. *AJNR Am J Neuroradiol*, 11 (3): 423-429.

Naidich TP, Duvernoy HM, Delman BN, Sorensen AG, Kolia SS, Haacke EM. 2008. Duvernoy's atlas of the human brainstem and cerebellum, 1st ed. Springer, Vienna.

Nakada T, Nakayama N, Fujii Y, Kwee IL. 1999. Clinical application of three-dimensional anisotropy contrast magnetic resonance anxonography. *J Neurosurg*, 90: 791-795.

Ono M, Kubik S, Abernathey CD. 1990. Atlas of the cerebral sulci. Stuttgart, New York: G. Thieme Verlag ; Thieme Medical Publishers.

Penfield W, Boldrey E. 1937. Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation. *Brain*, 60 (4): 389-443.

Perkowitz S. 1998. Eine kurze Geschichte des Lichts. Die Erforschung eines Mysteriums. München: Deutscher Taschenbuch Verlag.

Rye DB. 1999. Tracking neural pathways with MRI. *TINS*, 22: 373-374.

Saur D, Kreher BW, Schnell S, Kümmerer D, Kellmeyer P, Vry MS, Umarova R, Musso M, Glauche V, Abel S, Huber W, Rijntjes M, Henning J, Weiler C. 2008. Ventral and dorsal pathways for language. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 18035-18040.

Scheuner G, Hutschenreiter J. 1972. Polarisationsmikroskopie in der Histophysik. Leipzig: G. Thieme Verlag.

Schmahmann JD, Pandya DN. 2009. Fiber pathways of the brain, 1st ed. Oxford University Press.

Schmahmann JD, Pandya DN, Wang R, Dai G, D'Arceuil HE, de Crespigny AJ, Wedeen VJ. 2007. Association fiber pathways of the brain: parallel observations from diffusion spectrum imaging and autoradiography. *Brain* 130, 630-653.

Schmidt WJ. 1924. Die Bausteine des Tierkörpers im polarisierten Lichte. Bonn: Cohen.

Stieltjes B, Kaufmann WE, Van Zijl PCM, Fredericksen K, Pearlson GD, Solaiyappan M, Mori S. 2001. Diffusion tensor imaging and axonal tracking in the human brainstem. *Neuroimage*, 14(3): 723-35.

Struve Gv. 1843. Die Geschichte der Phrenologie. Heidelberg: Druck und Verlag von Karl Groos.

Talairach J. 1967. Atlas d'anatomie stéréotaxique du télencéphale, études anatomo-radiologiques. Paris: Masson et Cie.

Talairach J, Tournoux P. 1988. Co-Planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain. NewYork: Thieme.

Vogt O. 1902. Neurobiologische Arbeiten. Erste Serie: Beiträge zur Hirnfaserlehre. Jena: Fischer.

Wakana S, Jiang H, Nagae-Poetscher LM, van Zijl PC, Mori S. 2004. Fiber tractbased atlas of human white matter anatomy. *Radiology*, 230 (1): 77-87.

Walther T, Walther H. 2010. Was ist Licht? Von der klassischen Optik zu Quantenoptik. Dritte Aufl. München, Beck.

Weiller C, Bormann T, Saur D, Musso M, Rijntjes M. 2011. How the ventral pathway got lost: and what ist recovery might mean. *Brain and language*, 118(1-2), 29-39.

Wright SJ, Centonze VE, Stricker SA, De Vries PJ, Paddock SW, Schatten G. 1993. Introduction to confocal microscopy and three-dimensional reconstruction. *Methods Cell Biol*, 38: 1-45.

Yamada K, Kizu O, Mori S, ITO H, Nakamura H, Yuen S, Kubota T, Tanaka O, Akada W, Sasajima H, Mineura K, Nishimura T. 2003. Brain fiber tracking with clinically feasible diffusion tensor MR imaging: initial experience. *Radiology*, 227(1): 295-301.

Yeterian EH, Pandya DN, Tomaiuolo F, Petrides M. 2012. The cortical connectivity of the prefrontal cortex in the monkey brain. *Cortex*, 48(1), 58-81.

Zaun J. 2002. *Instrumente für die Wissenschaft. Innovationen in der Berliner Feinmechanik und Optik 1871–1914*. Berlin, Verlag für Wissenschafts- und Regionalgeschichte.

9 Abbildungsverzeichnis

Dedikationsbild: *Gonepteryx rhamni*, mit freundlicher Genehmigung von Dr. Scheel T.

Abb. 1: Gall, F. J.: Gravierung von Friedrich Wilhelm Bollinger (1777-1825) nach einem Portrait von Karl Heinrich Rahl, 1812; aus Wikimedia Commons, Public Domain.

Abb. 2: Phrenologie: 1894; Friedrich Eduard Bilz (1842–1922): Das neue Naturheilverfahren (75. Jubiläumsausgabe); aus Wikimedia Commons, Public Domain.

Abb. 3: Fritsch, G. T., Prof.: Portrait von 1898; Hersteller Rudolf Dührkoop 1848-1918; aus Wikimedia Commons, Public Domain.

Abb. 4: Hitzig, E., Prof.: 1898; unbekannter Autor; aus Wikimedia Commons, Public Domain.

Abb. 5: Broca, P. P., Dr.: Photographie um 1860, Photograph unbekannt, aus Wikimedia Commons, Public Domain.

Abb. 6: Wernicke, C., Prof.: von J.F. Lehmann, Muenchen, vor 1905; aus Wikimedia Commons, Public Domain.

Abb. 7: Brodmann, K., Prof.: Photographie vor 1905 entstanden, unbekannter Photograph, aus Wikimedia Commons, Public Domain.

Abb. 8: Brodmann Areale: Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues, Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig, 1909; Autor K. Brodmann; aus Wikimedia Commons, Public Domain.

Abb. 9: Penfield, W., Prof.: Portrait, 1934; unbekannter Photograph; aus Wikimedia Commons, Public Domain.

Abb. 10: Homunkulus: Bekannte Darstellung eines kortikalen Homunkulus nach Wilder Penfield. Gezeigt ist der motorische Kortex. Btarski, GNU Free Documentation License.

Abb. 11: Bartholinus, E., Prof.: Portrait aus dem 17. Jahrhundert; Maler unbekannt; aus Wikimedia Commons, Public Domain.

Abb. 12: Malus, E. L. (1775-1812): Portrait, Anfang des 19. Jahrhunderts; gedruckt durch Ambroise Tardieu (1788-1841); aus Wikimedia Commons, Public Domain.

Abb. 13: Brewster, D., Dr.: Portrait, ca. 1850; aus Wikimedia Commons, Public Domain.

Abb. 14: Talbot, W. H. F.: Portrait, 1934; Photograph Antoine Claudet (1797-1867); aus Wikimedia Commons, Public Domain.

Abb. 15: Amici, G. B., Prof.: Portrait, 1874, von Michele Gordigiani (1835-1909), aus Museo Galileo, Florence - Photographic Archives.

Abb. 16: Polarisationsmikroskop: aus Valentin G. G. "Grundriß der Physiologie des Menschen. Für das erste Studium und zur Selbstbelehrung.", 1851.

Abb. 17: Gefriermicrotom HM 500 OM, Walldorf: Bild aus Southeast Pathology Instrument Service, 1533 Folly Rd, Charleston, SC 29412, Vereinigte Staaten.

Abb. 18: Hirnschnitte, eigenes Bild.

Abb. 19: Schematische Darstellung der Apparatur.

Abb. 20: 3D-Koordinatensystem.

Abb. 21: Anatomisches 3D-Koordinatensystem.

Abb. 22: 3D-Koordinatensystem mit Richtungs- und Neigungswinkeln, eigenes Bild.

Abb. 23: Polarisationsapparatur mit gekreuzten Polarisatoren, Viertelwellenplatte und Objektträgertisch, eigenes Bild.

Abb. 24: Gesamte Polarisationsapparatur, eigenes Bild.

Tab. 1: Angewandte Parameter zur Ausrichtung serieller Schnitte, Axer et al., 2002.

Abb. 25: Rekonstruierte Datenvolumina des Pons, eigenes Bild.

Abb. 26: Faserneigungskarte, Vergrößerung mit Rotationswinkel von 50°, eigenes Bild.

Abb. 27: Faserneigungskarten des Hirnstamms, eigene Bilder.

Abb. 28: Vergrößerung einer Faserrichtungskarte des Hirnstamms mit Rotationswinkel von 160°, eigenes Bild.

Abb. 29: Faserrichtungskarten des Hirnstamms, eigene Bilder.

Abb. 30: Vergrößerung einer R-, G-, B-Karte des Hirnstamms, eigenes Bild.

Abb. 31: RGB-Karten des Hirnstamms, eigene Bilder.

Abb. 32: Faserorientierungskarten eines Schnittes durch den Pons, eigenes Bild.

Abb. 33: Dreidimensionaler Datensatz des Hirnstamms, eigenes Bild.

Abb. 34: 3D rekonstruierte Modelle der Hauptfaserbahnen des Hirnstamms, eigenes Bild.

Abb. 35: 3D-rekonstruierte Nervenfaserbahnen, eigene Bilder.

10 Anhang

10.1 Lebenslauf

Name, Vorname	Leunert, Matthias
Geboren	11.04.1974 in Paris
Staatsangehörigkeit:	D/F
Familienstand:	Verheiratet, Tochter Elisa

Beruflicher Werdegang

Seit 10/2013	Assistenzarzt für Neurochirurgie im Clemenshospital GmbH Münster (Prof. Schick)
08/2011 – 09/2013	Assistenzarzt für Neurochirurgie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Prof. Mehdorn)
10/2007-08/2011	Assistenzarzt für Neurochirurgie im Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Trier e.V. (Prof. Bettag)

Ausbildung

1997-2007	Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen
1995-1997	Zivildienst im Kreiskrankenhaus Mechernich
1988-1995	St. Angela Gymnasium, Bad Münstereifel, Abitur
1985-1988	Lycée Buffon, Paris
1978-1985	École primaire Cardinal Amette, Paris

10.2 Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Hubertus Axer, gilt für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, die freundliche Betreuung bei der Durchführung der Arbeiten, die Geduld während der Anfertigung und für die zahlreichen Hilfestellungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, mein besonderer Dank.

Herrn Univ-Prof. i.R. Dr. med. Diedrich Graf von Keyserlingk danke ich sehr für die Zeit der Betreuung bis zum Abschluß der Experimente.

Für die gute Zusammenarbeit während der endlosen Stunden der Datenakquirierung und –verarbeitung möchte ich mich bei meinem wissenschaftlichen Kollegen Herrn Dr. med. Malte Mürköster bedanken.

Weiterer Dank gilt Frau Anita Agbedor und Herrn Andre Doering vom anatomischen Institut der rheinisch-westfälischen technischen Hochschule Aachen für die Präparation des Gehirns und das Zuschneiden am Mikrotom.

Meinen Eltern, die mich bei der Entstehung meiner Vorstellungen und dem Verfolgen meiner Ziele stets tatkräftig unterstützt haben, danke ich von ganzem Herzen.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Frau für die viele aufmunternde Worte und fröhlichen Ansporn bedanken. Aber auch die liebevolle gutmütige Duldung während der Anfertigung dieser Arbeit sei hier erwähnt, denn es ist ihr stets gelungen, mich auch in Stunden meiner energiearmen Inspirationslosigkeit auf den Pfad der Kreativität zurückzuleiten.

10.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Univ.-Prof. Dr. med. Hubertus Axer,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben,

die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe

und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

Matthias Jörg Bruno Leunert